

**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Interacção Parasita-Hospedeiro e susceptibilidade de
Leishmania infantum a fármacos**

**Carla Alexandra Soares Maia
Lisboa 2008**

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor no Ramo das Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia, pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Este trabalho foi realizado na Unidade de Leishmanioses, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, sob orientação da Professora Doutora Lenea Campino.

O financiamento foi concedido pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior através da bolsa de doutoramento SFRH / BD / 12523 / 2003 do programa POCI 2010- Formação Avançada para a Ciência e do projecto POCI/CVT/56357/2004 aprovado pela FCT e pelo POCI, participado pelo fundo comunitário europeu FEDER.

A todos os animais de experimentação
que deram a sua vida à Ciência e, em
especial, aos “meus” beagles que
fizeram com que tudo valesse a pena

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

‘Para ser Grande’
Odes de Ricardo Reis

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	XX
RESUMO	XXIV
SUMMARY	XXVIII
OBJECTIVOS	XXXII

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1. Parasita	3
2. Hospedeiro	4
2.1. Hospedeiro vertebrado	4
2.2. Hospedeiro invertebrado – Vector	6
3. Ciclo Biológico	8
4. Epidemiologia das Leishmanioses	13
4.1. Leishmaniose cutânea	14
4.2. Leishmaniose mucocutânea	17
4.3. Leishmaniose visceral	18
4.4. Leishmanioses em Portugal	20
5. Interacção Parasita-Hospedeiro	23
5.1. Resistência aos componentes citotóxicos do soro e invasão do macrófago	23
5.2. Apoptose	25
5.3. Invasão de neutrófilos e de células com capacidade leishmanicida reduzida	26
5.4. Sobrevivência e multiplicação nos macrófagos	27
5.5. Modulação da resposta imune	28
5.6. Regulação genética da infecção	33

6. Métodos de Diagnóstico Laboratorial das Leishmanioses	35
6.1. Diagnóstico parasitológico	35
6.2. Diagnóstico seroimunológico	37
6.2.1. Imunidade humoral	37
6.2.2. Imunidade celular	40
6.3. Diagnóstico molecular	42
6.3.1. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)	42
6.3.2. Reacção em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)	43
 7. Modelo Animal	 45
7.1. O murganho	46
7.2. O hamster	48
7.3. O cão	49
7.4. Os primatas	52
7.5. O gato	52
 8. Leishmaniose Canina	 53
8.1. Epidemiologia	54
8.2. Patogenia e sinais clínicos	54
 9. Tratamento e Químio-resistência das Leishmanioses	 60
 10. Medidas de Controlo das Leishmanioses	 67

CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* NO CÃO

2.1. Material e Métodos	75
2.1.1. Animais	75
2.1.2. Parasitas	76
2.1.2.1. Promastigotas	77
2.1.2.2. Amastigotas	77
2.1.3. Inoculação	78

2.1.4. Observação clínica	78
2.1.4.1. Registo diário	78
2.1.4.2. Exame físico/clínico	79
2.1.4.3. Exame oftalmológico	79
2.1.5. Recolha de material biológico	80
2.1.5.1. Sangue periférico	80
2.1.5.2. Biópsia de medula óssea	80
2.1.5.3. Colheita de células conjuntivais	81
2.1.5.4. Colheita de amostras <i>post mortem</i>	81
2.1.6. Determinação dos parâmetros hematológicos e proteinograma	82
2.1.7. Estudos parasitológicos	82
2.1.7.1. Exame directo	82
2.1.7.2. Exame cultural	83
2.1.8. Estudos da imunidade humoral	83
2.1.8.1. Imunofluorescência indirecta	84
2.1.8.2. Contraimunoelectroforese	85
2.1.8.3. Testes imunocromatográficos rápidos	85
2.1.8.4. Técnica de ELISA	86
2.1.8.5. Teste de aglutinação directa	86
2.1.9. Estudos da imunidade celular	87
2.1.9.1. Proliferação linfocitária	87
2.1.9.2. Produção <i>in vitro</i> de citocinas	89
2.1.9.3. Estudo da expressão de citocinas através do RNA mensageiro, por RT-PCR	90
2.1.9.3.1. Extracção de RNA	90
2.1.9.3.2. Transcrição reversa do RNA	92
2.1.9.3.3. Amplificação do cDNA por PCR	92
2.1.9.4. Produção de óxido nítrico	94
2.1.10. Estudos moleculares	94
2.1.10.1. Extracção de DNA	94
2.1.10.2. Oligonucleótidos	96
2.1.10.3. Reacção de PCR	97
2.1.10.4. Reacção de qRT-PCR	98
2.1.10.5. Determinação da carga parasitária	98

2.1.11. Análise histopatológica	99
2.1.12. Análise estatística	99
2.2. Resultados	100
2.2.1. Observação clínica	100
2.2.1.1. Exame físico/clínico	100
2.2.1.2. Exame oftalmológico	101
2.2.1.3. Parâmetros hematológicos e proteinograma	102
2.2.2. Estudos parasitológicos	104
2.2.2.1. Exame directo	104
2.2.2.2. Exame cultural	104
2.2.3. Estudos de imunidade	105
2.2.3.1. Imunidade humoral	105
2.2.3.2. Imunidade celular	108
2.2.3.2.1. Proliferação linfocitária	108
2.2.3.2.2. Quantificação de citocinas produzidas por linfócitos e macrófagos	108
2.2.3.2.3. Expressão de citocinas nos diferentes tecidos infectados	109
2.2.3.2.4. Produção de óxido nítrico	114
2.2.4. Análise molecular: PCR e qRT-PCR	114
2.2.5. Análise histopatológica	117
2.3. Discussão	119

CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DE BALB/C COM ESTIRPE DE *L. infantum* TRATADA COM ANFOTERICINA B NA PRESENÇA DE GLÂNDULAS SALIVARES DE *Phlebotomus perniciosus*

3.1. Material e Métodos	138
3.1.1. Animais	138
3.1.2. Parasitas	138
3.1.3. Glândulas salivares de <i>P. perniciosus</i>	138
3.1.4. Inoculação	139
3.1.5. Recolha de material biológico	139

3.1.6. Estudos parasitológicos	140
3.1.7. Estudos moleculares	140
3.1.8. Estudos Imunológicos	140
3.1.8.1. Imunidade humoral	140
3.1.8.2. Imunidade celular	140
3.1.8.2.1. Proliferação linfocitária	140
3.1.8.2.2. Estudo da expressão da citocinas por qRT-PCR	141
3.1.8.2.3. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais	142
3.1.9. Infecção <i>in vitro</i> dos macrófagos peritoneais e determinação da susceptibilidade dos parasitas à anfotericina B	142
3.1.10. Análise estatística	143
3.2. Resultados	144
3.2.1. Estudos parasitológicos	144
3.2.2. Determinação da carga parasitária por qRT-PCR	144
3.2.3. Estudos seroimunológicos	147
3.2.4. Estudos da imunidade celular	147
3.2.4.1. Proliferação linfocitária	147
3.2.4.2. Expressão de citocinas	148
3.2.4.3. Produção de óxido nítrico	159
3.2.5. Determinação da susceptibilidade dos macrófagos peritoneais à anfotericina B	161
3.2.6. Observação clínica e mortalidade	163
3.3. Discussão	163

CAPÍTULO IV – INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *P. perniciosus* E *Lutzomyia longipalpis* COM PROMASTIGOTAS DE *L. infantum* TRATADOS OU NÃO COM ANFOTERICINA B

4.1. Material e Métodos	175
4.1.1. Preparação da membrana de pinto para alimentação artificial de fêmeas de flebótomos	175
4.2.1.1. Animais	175

4.1.2. Infecção de flebótomos com promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados ou não com anfotericina B	175
4.1.2.1. Parasitas	175
4.1.2.2. Flebótomos	176
4.1.2.3. Infecção dos flebótomos por alimentação artificial	176
4.1.3. Determinação da percentagem e intensidade da infecção	176
4.2. Resultados	177
4.2.1. Percentagem e intensidade da infecção dois dias após refeição artificial	177
4.2.2. Percentagem e intensidade da infecção dez dias após refeição artificial	180
4.3. Discussão	184
 CAPÍTULO V – Estudos de susceptibilidade de <i>Leishmania</i> a fármacos	
5.1. Material e Métodos	189
5.1.1. Fármacos utilizados	189
5.1.2. Estirpes de <i>Leishmania</i> utilizadas	189
5.1.3. Optimização do sistema de promastigotas axénicos	190
5.1.3.1. Contagem por microscopia óptica do número de promastigotas viáveis	190
5.1.3.2. Actividade da fosfatase ácida	190
5.1.3.3. Actividade da lactato desidrogenase	191
5.1.3.4. XTT	191
5.1.3.5. Actividade do PicoGreen®	191
5.1.4. Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos promastigotas axénicos aos fármacos em estudo	192
5.1.5. Optimização do sistema amastigota-macrófago	193
5.1.5.1. Selecção do sistema de macrófagos	193

5.1.5.1.1. Diferenciação de monócitos em macrófagos a partir do sangue periférico canino e humano	193
5.1.5.1.2. Diferenciação de monócitos em macrófagos a partir de células precursoras da medula óssea de murganhos (BMDM)	193
5.1.5.1.3. Macrófagos peritoneais derivados de murganhos	194
5.1.5.1.4. Diferenciação das células da linha monocitária U-937 em macrófagos	194
5.1.5.1.5. Macrófagos derivados da linha canina histiocitária DH82	195
5.1.5.2. Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	196
5.1.5.3. Determinação de dose máxima tolerada pela linha U-937 aos fármacos	196
5.1.6. Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos amastigotas intramacrofágicos aos fármacos	196
5.1.7. Apoptose nos amastigotas intramacrofágicos por acção dos fármacos	197
5.1.8. Produção <i>in vitro</i> de citocinas	198
5.1.9. Mecanismos de quimioresistência: identificação de alterações genéticas e padrões de resistência cruzada	199
5.1.9.1. Selecção <i>in vitro</i> de parasitas de <i>L. infantum</i> resistentes ao Fungizone® e avaliação de padrões de resistência cruzada (multiresistência)	199
5.1.9.2. Avaliação da estabilidade do fenótipo de resistência	199
5.1.9.3. Correlação entre fenótipos de resistência e alterações no gene <i>mdr</i>	199
5.1.10. Análise estatística	201
5.2. Resultados	201
5.2.1. Sistema promastigotas axénicos	201
5.2.2. Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos promastigotas axénicos aos fármacos	203
5.2.3. Sistema amastigota-macrófago	204
5.2.3.1. Selecção do sistema de macrófagos	204

5.2.3.2. Determinação de dose máxima tolerada pela linha U-937 aos fármacos	206
5.2.3.3. Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos amastigotas intramacrofágicos aos fármacos	207
5.2.4. Mecanismos de quimioresistência: identificação de alterações genéticas e padrões de resistência cruzada	208
5.2.4.1. Seleção <i>in vitro</i> de parasitas de <i>Leishmania</i> resistentes ao Fungizone® e avaliação de padrões de resistência cruzada	208
5.2.4.1.1. Formas promastigotas	208
5.2.4.1.2. Formas amastigotas	210
5.2.4.2. Avaliação da estabilidade do fenótipo de resistência	210
5.2.4.3. Fenótipos de resistência e alterações do gene <i>mdr</i>	211
5.2.5. Avaliação da ocorrência de apoptose nos amastigotas intramacrofágicos	214
5.2.6. Avaliação da produção <i>in vitro</i> de citocinas	216
5.2.6.1. Produção de IL-10	216
5.2.6.2. Produção de TNF- α	218
5.3. Discussão	220
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	233
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	239

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora científica, Professora Lenea Campino, Directora da Unidade de Leishmanioses, pelo estímulo e experiência partilhados e pela responsabilidade que me confiou, contribuindo assim para a minha formação técnico-científica e para o meu crescimento intelectual. Um obrigada muito especial por ter acreditado em mim, nas minhas “loucuras” e nos meus “speeds”. Foi uma grande e inigualável lição de vida.

À minha comissão tutorial, Professor Henrique Silveira, da Unidade de Malária do IHMT e Professor Pedro Cravo, da Unidade de Biologia Molecular do IHMT, o meu sincero apreço pela forma crítica e construtiva como acompanharam este trabalho.

Ao Theo, à Catherine, ao Nick e ao João pela confiança depositada na minha pessoa ao permitirem que actuasse como investigadora e médica veterinária responsável pelo estudo experimental e bem-estar animal num estudo clínico tão importante. Um obrigada especial ao Theo (e ao João pelo “forcing”) por me permitir a divulgação dos resultados obtidos. Não posso deixar de agradecer à Catherine por toda a ajuda (até altas horas da madrugada) na execução deste projecto e pelos incontáveis “notes to file” que preenchemos juntas.

Ao Professor Doutor Petr Volf pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade que me deu de realizar a infecção experimental dos flebótomos no seu laboratório de Parasitologia, na Faculty of Science Charles University, Praga, República Checa. Um obrigada especial à Doutora Vera Votipka, Doutora Jovana Sadlová, Dr^a Jitka Hostomska e Dr^a Lucie Jecna. Um abraço caloroso aos restantes membros da equipa por responderem às inúmeras questões por mim colocadas e por me fazerem sentir uma “sandfly girl”.

Ao Professor Luís Távora Tavira, pela disponibilidade e simpatia sempre manifestadas e como Coordenador do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, pelo apoio material concedido.

À Professora Catedrática de Parasitologia Montserrat Portús e ao Professor Jaume Carrió do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia, Universidade de Barcelona, Espanha pela disponibilidade demonstrada para a aprendizagem de técnicas que permitiram iniciar o estudo da susceptibilidade aos fármacos.

À Mestre Teresa Batista Fernandes, ao Doutor José Matoso e à Professora Teresa Marques do Serviço de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Cruz pela disponibilidade para me receberem e ensinarem a manutenção e utilização de linhas celulares.

Ao Doutor Javier Moreno e Professora Carmen Cañavate do Instituto de Salud Carlos III, Espanha pela cedência da linha celular DH82 assim como por todo o intercâmbio científico.

À Professora Esmeralda Delgado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, a quem agradeço a preciosa colaboração no exame oftalmológico dos Beagle.

À Professora Catedrática Conceição Peleteiro da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, a quem agradeço a preciosa colaboração na análise histopatológica dos órgãos obtidos aquando a necrópsia dos Beagle.

Ao Nuno Rolão a sua disponibilidade no acompanhamento deste estudo e pelos seus conhecimentos, os quais contribuíram para a concretização dos objectivos propostos.

À Mónica Nunes, a ajuda indispensável que deu à sua “chefinha” na execução de milhares de PCR e milhentos géis de agarose e às meninas “resistentes” Élia Cabrita, Mónica Marques e Sofia Henriques por toda o auxílio no estudo *in vivo* e *in vitro* relacionado com a quimio-resistência.

Ao Doutor Clement Bordier, Bordier Affinity Products SA, Suíça, pela oferta do kit de ELISA e do teste protótipo “Lateral-flow test for the diagnosis of dog visceral leishmaniosis” e ao Doutor Henk Schalling, KIT Biomedical Research, Holanda, pela oferta do antígeno liofilizado para a DAT.

Ao Manu Vanaerschot pelas horas que passámos online a “normalizar” genes.

À Zentaris, Alemanha pela oferta do Miltefosine; à Briston Myers Squibb, Portugal, pela oferta do Fungizone®; à Rhône Mérieux, Portugal pela oferta do Glucantime® e à Atral-Cipan, Portugal, pela oferta do Alopurinol.

Aos técnicos da Unidade de Leishmanioses, especialmente ao José Manuel Cristóvão pelo companheirismo e por todo o apoio prestado na recolha e processamento das infindáveis amostras, e à auxiliar de laboratório, Arminda Barbosa, pelo seu amor aos animais e pela oferta das coloridas violetinhas.

Aos meus colegas veterinários, Pedro Serra, Mafalda Lourenço, Margarida Alves, Pedro Silva, Esmeralda Delgado por todo o carinho e AMIZADE (e em alguns casos pelos muitos quilómetros percorridos) demonstrados nos momentos mais difíceis deste projecto. Aos meus amigos de sempre: João Alho, Bruno Baptista e Miguel Patrício.

Aos meus “meninos” Clara, Apolo e Atlas pelo “voluntariado à força” para optimização de algumas das técnicas utilizadas neste estudo.

À Professora Gabriela Santos Gomes e às minhas colegas “leishmaníacas” Sofia Cortes, Olívia Rodrigues, Cláudia Marques, Marta Clemente, Carina Esteves e Ana Farinha por todos os momentos científicos e não científicos que partilhamos.

À Professor Maria Odete Afonso da Unidade de Entomologia Médica/UPMM por me ajudar a sedimentar o meu gosto pela entomologia e por me iniciar no estudo da interacção parasita-vector. Agradeço também ao Professor Catedrático António Grácio, Director da Unidade de Entomologia pela disponibilidade manifestada e apoio logístico.

À Professora Luzia Gonçalves, da Unidade de Epidemiologia e Bioestatística, pela ajuda na análise estatística.

À minha MÃE e ao Pedro pelo apoio e incentivo incondicionais durante todo o meu percurso e, uma vez mais, o meu obrigada infinito a todos os animais de experimentação utilizados neste trabalho.

Aos restantes colegas, amigos e familiares (avó, onde quer que estejas, um beijinho) por estarem presentes.

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por um protozoário intracelular pertencente à ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, do género *Leishmania*. Os parasitas são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por dípteros pertencentes à sub-família Phlebotominae.

Devido à inexistência de vacinas a quimioterapia continua a representar o único mecanismo de prevenção e controlo. Os fármacos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose visceral continuam a ser os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B (AMB). A AMB lipossómica está a ser cada vez mais utilizada como 1ª linha. O conhecimento do(s) mecanismo(s) utilizados pelos parasitas, responsáveis pela resistência, é fundamental de modo a permitir o desenvolvimento de novos fármacos anti-*Leishmania* que possam substituir e/ou complementar os fármacos existentes, de uma forma eficaz assim como contribuir para o desenvolvimento de metodologias para avaliar e monitorizar a resistência.

Espera-se do modelo animal a reprodução da infecção na Natureza. Os modelos canino e murino têm ajudado na compreensão dos mecanismos responsáveis pela patogénese e pela resposta imunitária à infecção por *Leishmania*.

Sendo o cão o principal hospedeiro da infecção por *L. infantum* e o principal reservatório doméstico da leishmaniose visceral humana, procedeu-se à caracterização da evolução da infecção experimental em canídeos de raça Beagle através da análise clínica, hematológica, histopatológica, parasitária, assim como através da resposta imunitária desenvolvida. As alterações hematológicas observadas foram as associadas à leishmaniose visceral: anemia, leucopenia, trombocitopenia com aumento das proteínas totais e da fracção gama-globulina, e diminuição da albumina. Histologicamente observou-se nos órgãos viscerais uma reacção inflamatória crónica, acompanhada por vezes da formação de granulomas ricos em macrófagos. Apesar de todos os animais terem ficado infectados (confirmado pela presença do parasita nos vários tecidos e órgãos recolhidos na necrópsia), os únicos sinais clínicos observados transitoriamente foram adenopatia e alopecia. As técnicas moleculares foram significativamente mais eficazes na detecção do parasita do que os métodos parasitológicos convencionais. As amostras não invasivas (sangue periférico

e conjuntiva) mostraram ser significativamente menos eficazes na detecção de leishmanias. No nosso modelo experimental não se observou a supressão da resposta celular ao antígeno parasitário e confirmou-se que, apesar de não protectora, a resposta humoral específica é pronunciada e precoce. A bipolarização da resposta imunitária Th1 ou Th2, amplamente descrita nas infecções experimentais por *L. major* no modelo murino, não foram observadas neste estudo. O facto dos animais não evidenciarem doença apesar do elevado parasitismo nos órgãos viscerais poderá estar relacionado com a expressão simultânea de citocinas de ambos os tipos Th1 e Treg, no baço, fígado, gânglio, medula óssea e sangue periférico.

Neste estudo também se caracterizou o efeito da saliva do vector *Phlebotomus perniciosus* na infecção experimental de murganhos BALB/c com estirpes de *L. infantum* selvagem e tratada com AMB, inoculadas por via intradérmica. A visceralização da infecção ocorreu após a utilização da via de administração do inóculo que mais se assemelha ao que ocorre na Natureza. Apesar da disseminação dos parasitas nos animais co-inoculados com extracto de uma glândula salivar ter sido anterior à do grupo inoculado apenas com parasitas, não se detectaram diferenças significativas na carga parasitária, entre os três grupos, ao longo do período de observação pelo que, embora a saliva do vector esteja descrita como responsável pela exacerbação da infecção, tal não foi observado no nosso estudo. O aumento de expressão de citocinas esteve relacionado com o aumento do parasitismo mas, tal como no modelo canino, não se observou bipolarização da resposta imunitária. Os animais dos três grupos infectados parecem ter desenvolvido nos diferentes órgãos uma resposta mista dos tipos Th1 e Th2/Treg. Contudo, verificou-se a predominância da expressão Th1 (TNF- α), no fim do período de observação, o que pode estar relacionado com a resolução da infecção.

Por outro lado, a presença de parasitas na pele dos animais inoculados com a estirpe *L. infantum* tratada com AMB permite colocar a hipótese da existência de parasitas resistentes na Natureza e destes poderem ser transmitidos.

Após se ter verificado que a estirpe de *L. infantum* tratada com AMB tinha a capacidade de infectar e visceralizar no modelo murino, analisou-se o seu comportamento em dois dos principais vectores de *L. infantum*, *Lutzomyia longipalpis* e *P. perniciosus*. Os parasitas tratados com AMB apresentaram uma

menor capacidade de permanecerem no interior do vector assim como um desenvolvimento mais lento apontando para uma menor capacidade de transmissão das estirpes resistentes a este fármaco, pelo que o tratamento com AMB poderá ser favorável à prevenção e controlo através da interrupção do ciclo de vida do parasita.

De modo a determinar *in vitro* a susceptibilidade de *Leishmania* aos diferentes fármacos utilizados na terapêutica da leishmaniose humana e canina (Glucantime®, Fungizone®, miltefosine e alopurinol) comparou-se o sistema de promastigotas axénicos com o sistema amastigota-macrófago. Verificou-se que, para as estirpes estudadas, os resultados de ambos os sistemas não apresentavam diferenças significativas sendo a utilização do primeiro mais vantajosa ao ser menos moroso e de mais fácil execução. Seleccionaram-se estirpes quimio-resistentes *in vitro*, por exposição prolongada a doses crescentes de AMB, tendo-se verificado que os parasitas tratados, apresentaram uma menor susceptibilidade do que os não tratados à acção dos fármacos estudados, com excepção do alopurinol. A diminuição da susceptibilidade das estirpes aos fármacos utilizados poderá facilitar a dispersão de parasitas multiresistentes. Sendo a apoptose um dos mecanismos utilizados pelos parasitas para evitar a indução de uma resposta imune por acção de compostos anti-*Leishmania*, determinou-se o número de amastigotas apoptóticos assim como a produção de TNF- α e IL-10 pelos macrófagos tratados. Concluiu-se que os compostos conseguiram suprimir a produção de IL-10, inibidora da activação dos macrófagos, contudo nem a produção da citocina pro-inflamatória TNF- α nem a apoptose pareceram ser os principais mecanismos responsáveis à sobrevivência dos parasitas ao contacto com os fármacos.

SUMMARY

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by an intracellular protozoan belonging to the genus *Leishmania* and is transmitted between mammalian hosts by phlebotomine sand flies. Due to the inexistence of an effective vaccine, control and prevention relies mainly on chemotherapy. First-line drugs include pentavalent antimonials and amphotericin B (AMB) and its lipid formulation. A better understanding of resistance mechanism(s) would allow the development of new drugs which could substitute/complement the actions of the existing ones, as well the development of new diagnostics assays which could evaluate/monitor resistance. Animal models should mimic what happens in natural infection. The canine and murine models have proven useful in understanding the mechanisms of pathogenesis as well as the immunological response to *Leishmania* infection.

Since dogs are the main domestic reservoir hosts of *L. infantum* infection, we followed-up an experimental leishmaniasis canine infection. Clinical, haematological, histopathological, parasitological as well as humoral and cellular immunological parameters were analysed. The main haematological alterations were the ones commonly associated with visceral leishmaniasis: anaemia, leucopenia, thrombocytopathy and total proteins increasing with hyperglobulinemia. Histopathological analysis revealed a chronic inflammatory reaction in visceral organs, in some cases associated with granulomas rich in macrophages. Although all animals were infected (confirmed by parasite detection in all tissues and organs at necropsy), transient lymphadenopathy and alopecia were the only clinical signs observed. Molecular techniques were significantly more efficient in detecting parasite compared to “classic” parasitological techniques. Non-invasive samples (peripheral blood and conjunctiva) were less efficacious to detect *Leishmania*. In our model there was no suppression of cellular immune response to specific parasite antigen and humoral response although precocious and intense, was non-protective. The Th1/Th2 bipolarised immune responses, thoroughly described in the murine model of *L. major* experimental infections, were not observed in our model. The lack of clinical signs, despite the high parasite load observed in visceral organs, could be associated with a mix Th1/Treg response in the different tissues/organs analysed.

In this study we also analysed the effect of *Phlebotomus perniciosus* saliva in BALB/c mice intradermally infected with *L. infantum* wild type or with an AMB *in vitro* treated strain. The use of intradermal inoculation, which is closer to what happens in the natural course of infection due to transmission by the bite of a phlebotomine sand fly, allowed the visceralization of infection. Although mice co-inoculated with saliva showed parasite dissemination precocity to the internal organs, no significant difference in the parasite load was observed between groups. Cytokine expression was related with an increase of parasite load, but as was the case in the canine model, no Th1/Th2 bipolarised immune response was observed. All infected mice developed a mixed immune response in different tissues, with concomitant production of Th1, Th2 and Treg cytokines. However, at the end of experiment, the Th1 pro-inflammatory cytokine TNF- α was the most expressed and could be related with resolution of infection and parasite clearance. On the other hand, the presence of AMB treated parasites in the skin of the animals allowed us to hypothesized that AMB resistant strains could arise and be transmitted in Nature as a result of increased clinical used of AMB therapy .

After confirming that *L. infantum* AMB-treated parasites could infect and visceralize in the murine model, we analysed its capacity to develop in the two main *L. infantum* vectors, *Lutzomyia longipalpis* and *P. perniciosus*. Despite the low infection rate, promastigotes of AMB-treated strain were able to develop late-stage infections in the midgut of both sand flies species tested. Although more studies are needed to determine the vectorial capacity of sand flies to transmit AMB-resistant parasites, it seems that they have a lower capacity to be transmitted, so intentional selection of AMB-resistant parasites could be used in addition to control and prevent *Leishmania* transmission.

Axenic promastigotes and intracellular assays were compared in order to determine *in vitro* *Leishmania* susceptibility to the main drugs used in human and canine therapy in Portugal (Glucantime®, Fungizone®, miltefosine and allopurinol). Since no significant differences were observed between both assays, axenic promastigotes assays are easier to perform and less time-consuming. AMB treated parasites were obtained by subculturing promastigotes in media containing increasing concentrations

of this drug. AMB treated parasites were less susceptible than WT to Glucantime®, Fungizone® and miltefosine, except to allopurinol. The decreased susceptibility to the drugs currently used in chemotherapy could facilitate the spreading of multiresistant strains. Since most of anti-*Leishmania* drugs' action depends on host's immune response and as parasites use apoptosis as one of the mechanism to avoid it, we determined the number of apoptotic amastigotes as well as TNF- α and IL-10 production by infected and treated macrophages. It was verified a decreased IL-10 production by macrophages after drug treatment but neither TNF- α or apoptosis seemed to be the main mechanisms responsible for parasites' survival after treatment.

OBJECTIVOS

O presente estudo teve como objectivos principais (i) contribuir para o conhecimento do(s) mecanismo(s) responsáveis de susceptibilidade e/ou resistência de *Leishmania* aos principais fármacos utilizados na terapêutica das leishmanioses, (ii) caracterizar a evolução da infecção por *L. infantum* em modelo animal e avaliar os parâmetros importantes para análise da eficácia de moléculas candidatas a (imuno)terapia, (iii) caracterizar o efeito da saliva do vector *Phlebotomus perniciosus* na infecção, em modelo animal, com estirpes de *L. infantum* selvagem e tratada com fármaco anti-*Leishmania* assim como (iv) caracterizar o comportamento destas duas estirpes na infecção dos vectores.

Contribuição para o conhecimento do(s) mecanismo(s) responsáveis pela susceptibilidade de *Leishmania* a fármacos:

1. Estabelecimento de um sistema modelo *in vitro* para o estudo da susceptibilidade/resistência dos parasitas a diferentes fármacos.
2. Selecção de estirpes quimio-resistentes *in vitro* por exposição prolongada a doses crescentes de anfotericina B.
3. Correlacionar os vários fenótipos de resistência com polimorfismos do gene *mdr*.
4. Avaliação da resposta imunitária celular pela análise *in vitro* da produção das citocinas.

Caracterização da infecção no modelo canino:

1. Exame clínico dos canídeos de raça Beagle infectados experimentalmente por *L. infantum* e determinação laboratorial dos parâmetros hematológicos e proteinograma.
2. Análise parasitária. Determinação da presença do parasita por “métodos clássicos” (microscopia e cultura) e quantificação da carga parasitária por reacção em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

3. Análise da resposta imunitária. Avaliação da resposta humoral por pesquisa de anticorpos circulantes e da resposta celular, pela análise *in vitro* das respostas linfoproliferativas específicas e inespecíficas desenvolvida pelos linfócitos e pela produção de nítritos pelos macrófagos dos animais inoculados.

4. Caracterização da expressão génica de citocinas (Th1, Th2 e Treg) nos diferentes órgãos e tecidos pela técnica de transcritase reversa da reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR).

Caracterização da infecção no modelo murino:

1. Quantificação e análise da cinética do parasitismo ao nível dos diferentes órgãos e tecidos de grupos de murganhos BALB/c inoculados com uma estirpe *L. infantum* selvagem, com estirpe tratada com anfotericina B (AMB) e em animais co-inoculados com saliva de *Phlebotomus perniciosus*.

2. Análise da resposta imunitária. Avaliação da resposta humoral através da pesquisa de anticorpos circulantes. Avaliação da resposta celular desenvolvida no baço pela análise *in vitro* das respostas linfoproliferativas específicas e inespecíficas, assim como pela produção de nítritos pelos macrófagos peritoneais dos animais inoculados.

3. Caracterização da expressão génica de citocinas (Th1, Th2 e Treg) nos diferentes órgãos e tecidos pela técnica de qRT-PCR.

Caracterização da infecção no vector:

1. Determinação da percentagem de flebótomos infectados e da intensidade da infecção dois e dez dias após alimentação artificial com a estirpe *L. infantum* selvagem e com a tratada com AMB.

2. Determinação da localização dos parasitas no interior dos flebótomos.

3. Determinação da capacidade da estirpe tratadas com AMB se desenvolver no interior do vector de modo a antecipar a possibilidade de na natureza aparecem isolados resistentes ao fármaco.

CAPÍTULO I

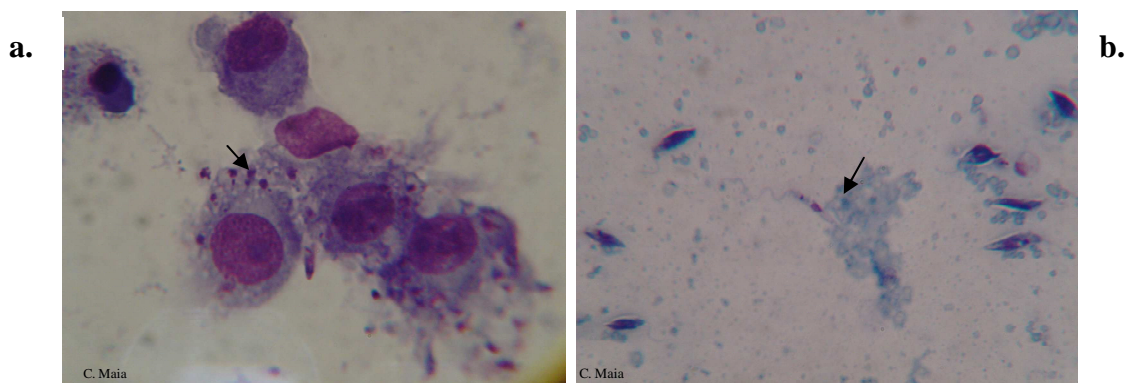
INTRODUÇÃO

As **leishmanioses** são doenças causadas por um protozoário intracelular pertencente à ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, do género *Leishmania* Ross, 1903 (Lainson & Shaw, 1987).

1. Parasita

Como todos os membros da família Kinetoplastida, o protozoário *Leishmania* apresenta um cinetoplasto, um núcleo e um único flagelo. Todas as espécies do género *Leishmania* têm duas formas no seu ciclo de vida: uma forma promastigota, no insecto vector, e uma forma amastigota, no hospedeiro vertebrado (Figura 1.1).

Figura 1. 1. Formas amastigotas (a.) e promastigotas (b.) de *Leishmania* spp.



As formas promastigotas são as formas encontradas no aparelho digestivo do vector e que podem também ser obtidas em culturas *in vitro*, a partir de tecidos parasitados dos hospedeiros vertebrados. Estas formas móveis, com 10-20 µm de comprimento e 1.5-3.0 µm de largura, possuem um flagelo livre, de comprimento variável, que emerge do corpo basal na extremidade anterior da célula, conferindo mobilidade ao parasita. O núcleo encontra-se numa posição central e o cinetoplasto localiza-se entre o núcleo e a extremidade anterior da célula.

No hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas surgem como formações ovóides ou arredondadas, com 2.5 a 6.8 μm de comprimento, sem flagelo livre. São formas obrigatoriamente intracelulares, parasitando as células fagocíticas mononucleares. Em preparações coradas pelo método de Giemsa distingue-se um citoplasma azul pálido limitado por uma membrana. No meio do citoplasma observam-se dois organelos corados de vermelho: o núcleo, relativamente grande e situado no polo posterior da célula, e o cinetoplasto, mais pequeno, em forma de bastonete e em posição anterior relativamente ao núcleo. O cinetoplasto contém uma quantidade importante de DNA (kDNA) e prolonga a única mitocôndria celular.

2. Hospedeiro

2.1. Hospedeiro vertebrado

A ecologia de *Leishmania* spp. está inevitavelmente associada aos hospedeiros em que se encontra, de modo que todos os factores que afectem a sobrevivência e o comportamento desses hospedeiros podem interferir no ciclo de transmissão do parasita. Um hospedeiro vertebrado pode ser classificado como reservatório se for a fonte da infecção humana (Deane, 1956) e se permitir que o parasita se multiplique indefinidamente (Ashford & Bettini, 1987), pelo que, para cada espécie de *Leishmania* existe um ou um número reduzido de reservatórios.

Das cerca de 30 espécies de *Leishmania* identificadas, 21 espécies infectam o Homem (Shaw, 1994). Estas infecções são maioritariamente zoonoses, tendo como hospedeiros principais mamíferos silváticos ou domésticos.

Nem todos os animais susceptíveis à infecção constituem bons reservatórios de *Leishmania*. Um animal que desenvolva uma doença aguda e recupere ou morra após alguns dias é considerado um “Mau” reservatório. Para que constitua um “Bom” reservatório é importante que a infecção que provoca seja de carácter crónico, isto é, que suporte a presença do parasita por um longo período de tempo antes da morte ou da cura (Killick-Kendrick & Ward, 1981; Bray, 1982). Para além da cronicidade Bray (1982) estabeleceu outros critérios que caracterizam um “Bom” reservatório: o animal tem de estar em estreito contacto com o homem através do vector, deverá apresentar o parasita ao vector em quantidade suficiente e no estado adequado para que lhe cause infecção. O reservatório deverá repousar e procriar numa situação climatérica favorável à alimentação sanguínea do vector. O animal reservatório deverá constituir

a principal fonte de alimentação para o vector. Deverá também, de preferência pertencer a uma espécie de animal que goste de viver em agregados (Ashford, 2000).

Rioux *et al.* (1969) consideram dois tipos fundamentais de reservatório animal: reservatório habitual e reservatório accidental. Destes, só o primeiro pode ser aceite como verdadeiro reservatório devendo-se chamar hospedeiro accidental ao segundo (Abranches, 1989).

No reservatório habitual há que distinguir, um reservatório primário ou natural (animais silváticos) de um reservatório secundário (cão). Os reservatórios naturais são animais que há muito tempo estão em contacto com o parasita e por isso existe já um equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita, o que faz com que as infecções sejam, em geral, assintomáticas ou oligossintomáticas, com uma evolução longa. Pelo contrário nos reservatórios secundários a doença é a regra (Garnham, 1965; Abranches, 1989; Campino, 1998).

Nos hospedeiros accidentais a parasitose só se desenvolve em condições excepcionais e raras e não desempenham papel significativo na epidemiologia das leishmanioses (Abranches, 1984; 1989). São exemplos de hospedeiros accidentais o urso, no Curdistão, (citado por Garnham, 1965), o porco-espinho, no Turquistão (WHO, 1980), o guaxinim na China (Zhi-Biao *et al.*, 1984), o cavalo, encontrado parasitado por *L. infantum* no Uganda, Itália, Alemanha, Espanha e Portugal e o morcego infectado por *L. chagasi* na Venezuela (Richardson, 1926; Koehler *et al.*, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2003; Rolão *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2008).

O primeiro caso de leishmaniose felina foi descrito na Argélia, em 1912, numa casa onde o animal co-habitava com uma criança e um cão com infecção visceral (Sergent *et al.*, 1912). Nos últimos anos um número significativo de casos de leishmaniose felina provocada por *L. infantum* têm sido descritos em Itália, França, Espanha, Suíça, Portugal e Brasil (Durão *et al.*, 1994; Pennisi *et al.*, 1998; Ozon *et al.*, 1998; Hervás *et al.*, 1999; 2001; Simões-Mattos *et al.*, 2001a; 2001b; Pennisi, 2002; Pennisi *et al.*, 2004; Poli *et al.*, 2002; Savani *et al.*, 2004; Grevot *et al.*, 2005; Leiva *et al.*, 2005; Rufenacht *et al.*, 2005; Vita *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007a; Maia *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008) mostrando a ampla distribuição geográfica e a prevalência da infecção nos gatos domésticos e peridomésticos. Se se tiver em conta que, na maioria dos casos, os felinos não apresentavam sinais clínicos e a produção de anticorpos anti-*Leishmania* ter sido baixa ou inexistente, o verdadeiro número de animais infectados pode estar

subestimado, facilitando a disseminação e transmissão do parasita por estes animais (Portús *et al.*, 2002).

Apesar de alguns autores considerarem os gatos como hospedeiros acidentais, existem fortes evidências que apontam para os gatos actuarem como reservatórios secundários (Gramiccia & Gradoni, 2005; Martin-Sánchez *et al.*, 2007, Solano-Gallego *et al.*, 2007a; Maia *et al.*, 2008). Num estudo realizado em Espanha acerca das preferências do vector *Phlebotomus perniciosus*, verificou-se que em todas as localidades prospectadas, os gatos serviram de fonte alimentar (Colmenares *et al.*, 1995a). Johnson *et al.* (1993) e Ogosuku *et al.* (1994) também observaram que os gatos são mais atraentes/atractivos para os flebótomos do que os cães. Recentemente, Maroli *et al.*, (2007) submeteram à técnica de xenodiagnóstico um gato infectado cronicamente por *L. infantum* e a taxa de *P. perniciosus* infectados foi semelhante à obtida com cães sintomáticos testados nas mesmas condições.

Casos raros de leishmaniose felina causada por *L. amazonensis* (Souza *et al.*, 2005), *L. venezuelensis* (Bonfante-Garrido *et al.*, 1991; 1996), *L. braziliensis* (Passos *et al.*, 1996; Schubach *et al.*, 2004) e *L. mexicana* (Craig *et al.*, 1986; Barnes *et al.*, 1993) também têm sido descritos.

Para se determinar o verdadeiro papel dos gatos na epidemiologia da leishmaniose zoonótica são necessários estudos mais aprofundados e em maior escala.

2.2. Hospedeiro invertebrado – Vector

Os parasitas são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por dípteros pertencentes a dois diferentes géneros da família Psychodidae: *Lutzomyia* França, 1924 no Novo Mundo e *Phlebotomus* Rondani, 1843 no Velho Mundo (Quadro 1.1).

Quadro 1.1. Patologia, vectores, reservatórios, distribuição geográfica e transmissão das leishmanioses (Killick-Kendrick, 1999; Sádlová, 1999; Ashford, 2000; Gramiccia & Gradoni, 2005; Bates, 2007).

	Patologia habitual		Distribuição geográfica	Vectores	Reservatórios	Transmissão
	Espécie	Patologia rara				
Velho Mundo	<i>Leishmania major</i>	LCL; LCD*	Norte, Este e Oeste de África; Próximo e Médio Oriente; Ásia Central; Índia	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i> <i>P. salehi</i> <i>P. alexandri</i> <i>P. ansarii</i> <i>P. caucasicus</i>	Roedores	Zoonótica Rural
	<i>Leishmania tropica</i>	LCL; LV	Médio Oriente; Paquistão; Índia; Norte de África; Quênia; Região Mediterrânea	<i>P. sergenti</i> <i>P. guggisbergi</i> <i>P. aculeatus</i>	Homem Canídeos (?) Hiraxes (?)	Antropométrica Urbana
	<i>Leishmania aethiopica</i>	LCL; LCD	Etiópia; Quênia	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Hiraxes	Zoonótica Rural
	<i>Leishmania donovani</i>	LV LCL LMC	Índia; Nepal; Bangladesh; Paquistão; China; Quênia; Etiópia; Sudão	<i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. martini</i> <i>P. celiae</i> <i>P. alexandri</i> <i>P. caucasicus</i>	Homem Roedores (?) Canídeos (?)	Antropométrica
	<i>Leishmania infantum</i>	LV LCL LCD* LMC*	Região Mediterrânea; Balcãs; Médio Oriente; Ásia Central; China; África Oriental	<i>P. perniciosus</i> <i>P. ariasi</i> <i>P. tobbi</i> <i>P. neglectus</i> <i>P. perfliewi</i> <i>P. kandelakii</i> <i>P. langeroni</i> <i>P. longicuspis</i> <i>P. smirnovi</i> <i>P. transcaucasicus</i> <i>P. chinensis</i> <i>P. longiductus</i>	Canídeos	Zoonótica Peridoméstica
Novo Mundo	<i>Leishmania chagasi</i>	LV LCL; LCD	América Central e do Sul	<i>L. longipalpis</i> <i>L. evansi</i>	Canídeos	Zoonótica Peridoméstica
	<i>Leishmania mexicana</i>	LCL LCD LV*	América Central e do Sul	<i>L. olmeca olmeca</i> <i>L. ayacuchensis</i> <i>L. ylephiletor</i> <i>L. anthophora</i>	Roedores Canídeos	Zoonótica Silvática
	<i>Leishmania amazonensis</i>	LCL; LDC MCL VL*	América do Sul	<i>L. flaviscutellata</i> <i>L. olmeca nociva</i> <i>L. reducta</i>	Roedores Marsupiais	Zoonótica Silvática
	<i>Leishmania venezuelensis</i>	LCL; LDL	Venezuela e República Dominicana	<i>L. olmeca bicolor</i>	Gatos (?)	Zoonótica (?)
	<i>Leishmania peruviana</i>	LCL	Perú	<i>L. peruensis</i> <i>L. verrucarum</i> <i>L. aracuchensis</i>	Canídeos (?) Homem (?)	Zoonótica
	<i>Leishmania panamensis</i>	LCL LCD* LMC*	América Central e do Sul	<i>L. trapidoi</i> <i>L. gomezi</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. ylephiletor</i>	Preguiças Roedores Marsupiais Canídeos	Zoonótica Silvática
	<i>Leishmania guyanensis</i>	LCL LMC*	América do Sul	<i>L. umbratilis</i> <i>L. whitmani</i> <i>L. anduzei</i>	Preguiças Roedores Marsupiais	Zoonótica Silvática
	<i>Leishmania lainsoni</i>	LCL	Brasil e Perú	<i>L. ubiquitalis</i>	Roedores	Zoonótica
	<i>Leishmania naiffi</i>	LCL	Brasil Guiana Francesa	<i>L. squamiventris</i> <i>L. paraensis</i>	Desdentados	Zoonótica Silvática
	<i>Leishmania shawi</i>	LCL	Brasil	<i>L. whitmani</i>	Primatas; Preguiças	Zoonótica
	<i>Leishmania braziliensis</i>	LCL LMC LCD LV*	América do Sul	<i>L. wellcomei</i> <i>L. complexus</i> <i>L. carrerai</i> <i>L. whitmani</i> <i>L. ovallesi</i>	Roedores Canídeos Equinos	Zoonótica Silvática

P. - *Phlebotomus*; L. - *Lutzomyia*; LV - Leishmaniose visceral; LCL - Leishmaniose cutânea localizada; LCD - Leishmaniose cutânea disseminada; LMC - Leishmaniose mucocutânea; * em estádios de imunodepressão

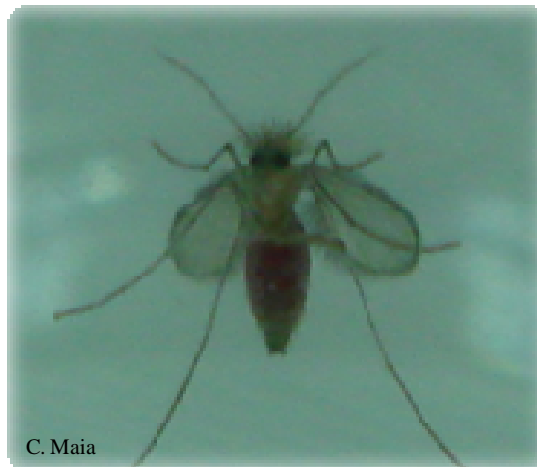
A identificação dos insectos vectores responsáveis pela transmissão de *Leishmania* necessita a reunião de várias evidências, tais como, a detecção de flebótomos naturalmente infectados, as infecções experimentais serem bem sucedidas e verificar-se preferência alimentar dos vectores pelos reservatórios descritos. Em muitos casos, uma determinada espécie de *Leishmania* é transmitida principal ou unicamente por uma dada espécie de vector numa região específica. A eficiência de transmissão do parasita pelos flebótomos é um processo que apresenta grande variabilidade e complexidade (Dye, 1992) e que depende da longevidade, das preferências tróficas e da densidade dos vectores. Outros factores que podem interferir no sucesso da transmissão do parasita relacionam-se com a interacção vector e reservatório, nomeadamente, a sobreposição de habitats, o carácter endofílico ou exofílico e o grau de antropofilia ou zoofilia dos vectores e as taxas de infecção no reservatório. Assim, populações de vectores que ocupem “habitats” junto a um “Bom” reservatório terão provavelmente uma maior capacidade de transmissão do parasita. No entanto, esta relação tem vindo a ser modificada ao longo de milhões de anos por pressões ecológicas que, em última análise, são a principal causa da variação genética das leishmanias.

3. Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *Leishmania* é um processo complexo que envolve alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas, sendo idêntico para todas as espécies de *Leishmania*.

As fêmeas dos insectos vectores, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, géneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), efectuem refeições sanguíneas para que se possa realizar a maturação ovárica e a postura. Assim, quando um flebotomíneo fêmea (Figura 1.2) efectua uma refeição hematófaga num hospedeiro vertebrado infectado por *Leishmania* e com parasitas no tecido cutâneo ou sanguíneo, ingere os protozoários na forma amastigota.

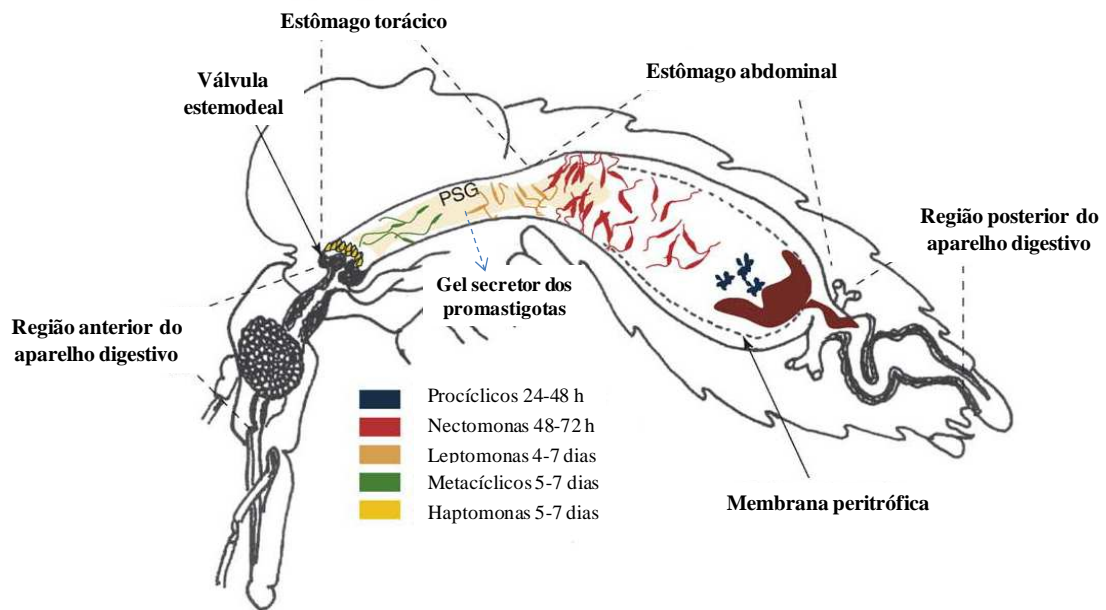
Figura 1.2. Fêmea de *Phlebotomus perniciosus* após refeição sanguínea.



Os parasitas, ingeridos juntamente com o sangue, passam directamente para o segmento abdominal do estômago do vector, onde são envolvidos pela membrana peritrófica (Figura 1.3). Esta membrana, constituída por quitina e glicoproteínas sintetizadas pelas células epiteliais do tubo digestivo do flebótomo, em resposta ao estímulo sanguíneo, protege o epitélio do estômago do conteúdo da refeição sanguínea e actua como uma barreira que regula a difusão de enzimas digestivas segregadas pelas células epiteliais (Pimenta *et al.*, 1997), encontrando-se completamente formada ao fim de 24 horas após a ingestão do sangue (Blackburn *et al.*, 1988; Walters *et al.*, 1993; Secundino *et al.*, 2005). A digestão da refeição sanguínea fica completa em quatro a cinco dias.

Para que o ciclo de vida de *Leishmania* no insecto seja bem sucedido, isto é, para que possa ocorrer transmissão, os parasitas têm que sobreviver à acção das enzimas digestivas do hospedeiro invertebrado, evitar serem expulsos do intestino durante a diurese e numa fase final, migrar para a zona anterior do estômago do vector e libertarem-se do epitélio intestinal. Para atingirem este objectivo os parasitas sofrem várias fases, nomeadamente multiplicação e alterações morfológicas. Segundo Bates (1994, 2007), durante o desenvolvimento intravectorial do parasita podem distinguir-se várias formas: promastigotas procíclicos, nectomonas, leptomonas, haptomonas e promastigotas metacíclicos que diferem não só morfológicamente, mas também na capacidade de divisão celular, mobilidade, ligação aos tecidos e grau de infectividade.

Figura 1.3. Ciclo de vida de *Leishmania* no vector ilustrando as diferentes formas morfológicas dos promastigotas (adaptado de Kamhawi, 2006).



Com o progredir da digestão, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicos. Estas formas pouco móveis (pequeno flagelo) multiplicam-se activamente e, passados 3 ou 4 dias após a refeição sanguínea, transformam-se em promastigotas longos e flagelados, denominados por nectomonas. A membrana peritrófica começa então a desintegrar-se, por acção de quitinases segregadas pelo vector e pelo parasita (Schlein *et al.*, 1991; Schlein, 1993; Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005), libertando os promastigotas livres para o estômago abdominal, no caso dos flebótomos vectores do subgénero *Viannia*, ou para o estômago torácico, no caso dos flebótomos vectores do subgénero *Leishmania*.

A capacidade das nectomonas persistirem após digestão da refeição sanguínea e de se fixarem ao epitélio do estômago através do flagelo, evitando deste modo a sua excreção, é determinante na classificação de uma espécie flebotomínica como vectora (Bates, 2007). Dá-se então início a uma fase de multiplicação activa e prosseguem a sua migração em direcção ao segmento anterior do estômago. Ao fim de 5 ou 6 dias após a ingestão, a refeição sanguínea encontra-se completamente digerida e as nectomonas atingem a válvula estemodeal, diferenciando-se em leptomonas (Gossage *et al.*, 2003).

Estas formas secretam o gel secretor dos promastigotas (PSG), uma glicoproteína filamentosa que forma uma matriz gelatinosa (Rogers *et al.*, 2002). Algumas das nectomonas/leptomonas aderem à superfície da válvula e diferenciam-se em haptomonas (Killick-Kendrick *et al.*, 1974). Finalmente algumas das leptomonas diferenciam-se nos promastigotas metacíclicos (Rogers *et al.*, 2002). As haptomonas posicionam-se na região da válvula estomodeal, aderindo entre si e à cutícula da válvula, formando-se um aglomerado de parasitas revestidos pelo PSG (Walters *et al.*, 1987; Killick-Kendrick *et al.*, 1988; Stierhof *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2002; Bates, 2007). Pensa-se que o PSG juntamente com as haptomonas têm como função bloquear parcialmente a válvula estomodeal, dificultando a entrada de sangue durante a refeição sanguínea. O insecto é, assim, obrigado a realizar várias picadas, facilitando a expulsão das formas metacíclicas infectantes (Killick-Kendrick & Ward, 1981; Killick-Kendrick, 1990; Killick-Kendrick *et al.*, 1997b). No desenvolvimento das formas metacíclicas, três moléculas parecem ter importância na infecciosidade do parasita: o lipofosfoglicano (LPG), a glicoproteína de 63 kDa (gp63) e a fosfatase ácida (Bryceson, 1996). As modificações ultraestruturais no LPG da superfície dos parasitas, que causam alterações funcionais como a perda da ligação às microvilosidades do intestino (Sacks *et al.*, 1985) permitem que as formas metacíclicas se movam livremente e se posicionem junto à válvula estomodeal, possibilitando a sua expulsão do aparelho bucal quando o insecto efectua nova refeição sanguínea.

Os parasitas do subgénero *Viannia* diferem dos parasitas do subgénero *Leishmania* por apresentarem uma fase adicional de desenvolvimento, fixos à superfície do estômago médio.

O ciclo do parasita nas diferentes espécies flebotomínicas pode ter uma duração de 4 a 17 dias após a refeição sanguínea da fêmea vectora, dependendo da espécie de *Leishmania* e da temperatura ambiental (Molyneux & Killick-Kendrick, 1987).

Os promastigotas metacíclicos são transmitidos através da picada telmofágica na pele do hospedeiro vertebrado juntamente com o PSG e a saliva do vector. O PSG é responsável pelo aumento do número de promastigotas metacíclicos inoculados (Rogers *et al.*, 2004, Bates, 2007). A saliva do flebótomo parece exercer várias funções imunomoduladoras e poder antagonizar certos componentes do sistema de defesa do hospedeiro (Warburg & Waitumbi, 1997; Waitumbi & Warburg, 1998).

Estudos experimentais efectuados em modelo murino, infectado por diferentes espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*), indicam que a saliva do vector induz um aumento do poder infectante do parasita (Titus & Ribeiro, 1988; Samuelson *et al.*, 1991; Theodos *et al.*, 1991; Warburg *et al.*, 1994; Lima & Titus, 1996; Belkaid *et al.*, 2000). Aparentemente, o efeito da saliva não se fica a dever à sua acção directa sobre o parasita, mas sim sobre o hospedeiro, pois contém um potente vasodilatador que, além de facilitar a refeição sanguínea do vector, parece inibir a acção leishmanicida do macrófago (Titus & Ribeiro, 1988; Lima & Titus, 1996). Por outro lado, estudos mais recentes demonstraram que a exposição prévia de murganhos BALB/c a picadas de flebótomos, não infectados, conferia imunidade a uma posterior infecção por *Leishmania* (Belkaid *et al.*, 1998; Kamhawi *et al.*, 2000). Também a vacinação com fracções proteicas da saliva de *L. longipalpis* impediu a evolução até à morte em hamsters infectados por *L. donovani* (Gomes *et al.*, 2008). Estes resultados não foram reproduzidos por Moura *et al.* (2007) ao pré-imunizarem murganhos BALB/c com saliva de *L. intermedia*, apesar do aparecimento da lesão ter sido mais tardio, no local de inoculação e nos gânglios regionais ocorreu multiplicação parasitária. Estes resultados, em conjunto com a elevada imunogenicidade demonstrada por proteínas da saliva dos flebótomos, reforçam a importância da saliva no estabelecimento da infecção por *Leishmania* no mamífero hospedeiro (Andrade *et al.*, 2007).

Os promastigotas metacíclicos são fagocitados pelos macrófagos da pele, onde se transformam em amastigotas. As formas amastigotas iniciam um processo de multiplicação activa, acabando por provocar a destruição da membrana da célula hospedeira e subsequente libertação dos parasitas que vão infectar novos macrófagos. Os parasitas fagocitados podem permanecer no tecido subcutâneo, dando origem às formas clínicas de leishmaniose cutânea, ou invadir as células do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, fígado, medula óssea, gânglios linfáticos e outros órgãos linfóides (Bryceson, 1996), causando a leishmaniose visceral.

Se a infecção for bem sucedida no hospedeiro vertebrado o ciclo intravectorial recomeça quando o flebótomo fêmea, susceptível ao parasita, faz uma nova refeição sanguínea, ingerindo macrófagos infectados.

Vários estudos têm demonstrado que a transmissão do parasita se pode processar sem interferência do insecto vector. Estão descritos casos de transmissão congénita (Mittal *et al.*, 1987; Nyakundi *et al.*, 1988; Yadav *et al.*, 1989; Eltoum *et*

al., 1992; Elamin & Omer, 1992; Meinecke *et al.*, 1997), transmissão venérea (Symmers, 1960; Rosenthal *et al.*, 1988), transmissão mecânica por seringa e agulha entre indivíduos toxicodependentes, administradas por via endovenosa, (Alvar & Jimenez, 1994; Campino *et al.*, 1994) e por transfusão de sangue contaminado (Singh *et al.*, 1996; Dedet, 2000; Giger *et al.*, 2002). O transplante de órgãos poderá também ser uma via de infecção (Bourré *et al.*, 1990; Horber *et al.*, 1993; Dedet, 2000).

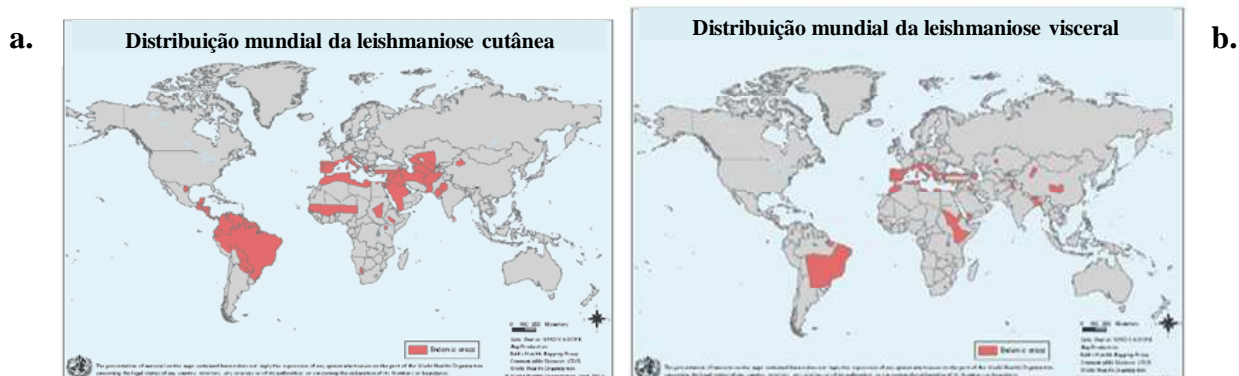
Foi aceite a hipótese de transmissão de *Leishmania* por contacto directo, entre cães, no Norte da Europa, onde é desconhecida a existência de vectores, têm sido descritos casos de infecção em animais que nunca saíram daquela zona geográfica (Slappendel & Teske, 1999). A transmissão directa da infecção por *Leishmania* por via sexual entre cães e a transmissão vertical também foram descritas em canídeos (Mancianti & Sozzi, 1995; Rosypal *et al.*, 2005b). Em dois cães foi detectado o parasita na urina e no sêmen (Riera & Valadares, 1996). Contudo, a maior parte destas vias de transmissão devem ser consideradas como excepções e sem repercussão na epidemiologia da leishmaniose.

4. Epidemiologia das Leishmanioses

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose é endémica em 88 países, presentes em todos os continentes, com excepção da Austrália e da Antárctica, correspondendo a 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção (Figura 1.4). A prevalência mundial é de 12 milhões de casos com milhão e meio a dois milhões de novos casos por ano: quinhentos mil casos de leishmaniose visceral e de um a um milhão e meio de novas leishmanioses cutâneas (WHO, 2004).

Durante muitos anos a sua importância na saúde pública foi subestimada, provavelmente devido à falta de consciencialização da população (WHO, 2004). Os números oficiais disponíveis parecem subestimar o número de casos reais, o que poderá ser devido a vários factores: a notificação não ser obrigatória em muitos dos países onde a doença é endémica; a maior parte dos dados oficiais ser obtida exclusivamente através de detecção passiva; a infecção ser apenas detectada em casos com sintomatologia; muitos doentes não terem acesso a assistência médica ou a meios de diagnóstico adequados (Desjeux, 1996; Campino, 1998; Alvar *et al.*, 2006).

Figura 1.4. Distribuição mundial da leishmaniose cutânea (a.) e visceral (b.) (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html).



O aumento do número de casos deve-se às mudanças no ambiente provocadas pelo Homem: a desflorestação, a construção de novos sistemas de irrigação e de diques, o alargamento das terras de cultivo, a construção de estradas em zonas florestais, a migração desde as zonas rurais para as zonas urbanas e a rápida urbanização do ambiente a nível mundial são os principais responsáveis pelo aumento da exposição ao flebótomo, assim como a redução ou ausência das pulverizações de insecticidas no enquadramento das campanhas antimaláricas (Desjeux, 1992). Outro factor de risco é o movimento de populações susceptíveis para áreas endémicas ou infectadas para áreas não imunes.

A maioria das infecções ocorrem como zoonoses de animais silváticos ou domésticos e o homem é apenas infectado acidentalmente, quando exposto ao ciclo natural de transmissão. De um modo geral, dependendo do grau de invasão do hospedeiro, as espécies de *Leishmania* podem dividir-se em dermatrópicas e viscerotrópicas.

4.1. Leishmaniose cutânea

Em geral, as características clínicas das leishmanioses cutâneas (LC) não são uniformes nas várias regiões geográficas, nem mesmo dentro de uma mesma região. As diferenças advêm da espécie parasitária e, da informação genética do hospedeiro responsável pela resposta imunológica do indivíduo infectado (Campino, 1998). As LC abrangem uma série de variantes clínicas que vão desde uma única lesão de cura espontânea, a lesões múltiplas localizadas ou difusas com evolução crónica.

A lesão “clássica” da leishmaniose cutânea localizada (LCL) caracteriza-se pela formação de um nódulo local, induzido pela picada do vector, que ulcera e cura espontaneamente, deixando uma cicatriz indelével e com alteração da pigmentação cutânea.

No Velho Mundo as principais espécies responsáveis pelas LCL pertencem aos complexos *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914, *Leishmania tropica* Wright, 1903, *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford & Bray, 1973, bem como alguns zimodemos considerados dermatrópicos de *L. infantum* no Sul da Europa e no Norte de África (Belazzoug *et al.*, 1985; Jiménez *et al.*, 1991; Marty *et al.*, 1994; Pratlong *et al.*, 1995; Campino & Abranches, 2002).

L. major usualmente afecta os membros, e as lesões nos lábios ou no nariz não invadem as mucosas. Durante as epidemias a doença tende a ser mais grave, ocorrendo lesões múltiplas que por vezes ulceram profundamente, deixando cicatrizes desfigurantes (Desjeux, 1996). Os reservatórios habituais são roedores.

A *L. tropica* é o agente da LC considerada antroponótica e as lesões são, na maior parte dos casos, encontradas na face.

O cão foi referido como hospedeiro accidental destas duas espécies (Morsy *et al.*, 1987; Dereure *et al.*, 1991a; 1991b; Guessous-Idrissi *et al.*, 1997; Sadlová, 1999).

L. aethiopica tem como principal reservatório os hiraxes e provoca lesões únicas na face. Quando a lesão se situa no bordo mucocutâneo do nariz ou da boca, a infecção pode espalhar-se ao longo das margens mucocutâneas e persistir durante anos, sem contudo apresentar a severa destruição dos tecidos verificada da leishmaniose mucocutânea (Berhe *et al.*, 1995).

As LCL causadas por *L. infantum* são geralmente pouco agressivas e as lesões nodulares situam-se comumente na face tendendo a evoluir para a cura, embora, possam ocorrer, muito raramente, lesões nas mucosas da boca, nariz e laringe (Campino, 1998).

No Novo Mundo, a LCL está associada às espécies de *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911, *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw, 1979, *Leishmania mexicana* Biag, 1953, *Leishmania peruviana* Velez, 1913, *Leishmania panamensis* Lainson & Shaw, 1972, *Leishmania guyanensis* Floch, 1954, *L. venezuelensis* Bonfante-Garrido, 1980. Estas espécies encontram-se nas zonas de floresta tropical, e as suas áreas de distribuição geográfica sobrepõem-se, com a excepção de *L. peruviana*, o que tem dificultado a clara identificação dos ciclos epidemiológicos.

L. braziliensis é a causa mais comum e mais grave de LCL na América Central e do Sul. O cão e o cavalo são, provavelmente, os reservatórios de *L. braziliensis* nas áreas urbanas e suburbanas (Aguilar *et al.*, 1987; Sadlová, 1999). Esta espécie provoca no homem uma lesão profunda, usualmente simples, que ulcera rapidamente e que em aproximadamente 80% dos casos cicatriza num ano. No entanto, muitas pessoas mantêm úlceras durante anos. Cerca de 15% dos indivíduos afectados apresentam recaídas ou re-infecções. Em 2% a 40% das pessoas com úlceras cutâneas desenvolve-se posteriormente um quadro com invasão das mucosas.

L. amazonensis infecta uma grande variedade de hospedeiros roedores e marsupiais e ocorre na floresta amazónica do Brasil, na Bolívia, na Colômbia, no Equador, no Perú, na Guiana Francesa e na Venezuela. As lesões são geralmente únicas e sem envolvimento linfático.

L. mexicana tem como reservatório roedores e é o parasita mais frequente na península de Yucatán no México mas estende-se através da Guatemala, das Honduras, do Panamá e da Colômbia, causando lesões na face ou na região posterior do pavilhão auricular (úlceras dos chicleros) que curam em seis a oito meses. Quando o pavilhão auricular é atingido a infecção pode tornar-se crónica, provocando a destruição da cartilagem.

L. peruviana, agente causador da “Uta”, existe nos vales Andinos do Perú e nas terras altas da Argentina. O cão é considerado o reservatório doméstico desta espécie, suspeitando-se da existência de um reservatório silvático roedor nas florestas que cobrem as escarpas montanhosas (Bryceson, 1996; Sadlová, 1999). As lesões surgem usualmente em crianças e localizam-se na face, podendo atingir os bordos mucocutâneos quando a úlcera primária se situa no nariz ou nos lábios. Nos Andes e na Argentina o cão é o reservatório de *L. peruviana* mais provável.

L. guyanensis, responsável pelo “Pian-bois”, existente na Guiana Francesa e no Brasil, provoca lesões múltiplas no tronco ou nos membros, podendo haver envolvimento dos vasos linfáticos, com disseminação da infecção por via linfática (Dedet, 1990).

O parasita dominante na América Central é *L. panamensis*. A infecção também se dissemina através dos vasos linfáticos podendo as lesões persistir por muitos anos.

A *L. guyanensis* e *L. panamensis* têm como reservatórios várias espécies de preguiças que habitam as florestas, tendo sido também descritos como hospedeiros algumas espécies de marsupiais.

L. venezuelensis existe no estado de Lara, na Venezuela tem como reservatório provável o gato doméstico (Bonfante-Garrido *et al.*, 1991)

Outras espécies descritas como *L. lainsoni* Silveira, Shaw, Braga e Ishikawa, 1987, *L. naiffi* Lainson & Shaw, 1989, e *L. shawi* Lainson & Shaw, 1989, têm sido encontradas em casos humanos de LC e causam geralmente uma única lesão cutânea, podendo também ocorrer metástases (Dedet, 1993).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma rara e de difícil cura, surgindo em indivíduos anérgicos (Convit, 1958). As lesões iniciais, nódulos isolados contendo no seu interior macrófagos infectados, disseminam-se e confluem, formando placas (Bryceson, 1996). Ao contrário das formas localizadas, a LCD não manifesta tendência para a cura espontânea e apresenta resistência à terapêutica anti-*Leishmania*. Originalmente associada às espécies *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. amazonensis* no Novo Mundo, é actualmente encontrada como resultado de infecções provocadas por outras espécies, em casos de imunodeficiência associada à co-infecção por HIV (Coura *et al.*, 1987; Jiménez *et al.*, 1991) e ao transplante de órgãos (Bourré *et al.*, 1990).

4.2. Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea (LMC) ou “Espúndia”, surge como consequência da metastização secundária dos parasitas para as mucosas da face, a partir de uma lesão cutânea primária localizada, num processo que envolve a necrose dos tecidos moles das cartilagens nasofaríngeas que podem originar mutilações faciais graves. Esta forma de leishmaniose está geralmente associada à espécie *L. braziliensis*, mas foram já encontrados alguns casos provocados por *L. panamensis* (Dedet, 1994; Osorio *et al.*, 1998) e, por *L. infantum* no Velho Mundo (Alvar *et al.*, 1990; Tomson *et al.*, 2002; Aliaga *et al.*, 2003; Van Damme *et al.*, 2004; Lella *et al.*, 2006; Marcos *et al.*, 2007).

4.3. Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar de transmissão antroponótica é causada por *L. donovani* Laveran & Mesnil 1903, nas regiões endêmicas do subcontinente Indiano, China e África Oriental. No Norte do Quênia supõe-se que durante os surtos epidêmicos a transmissão da infecção se faz através do vector, homem a homem, sendo a transmissão zoonótica esporádica (Ashford & Bettini, 1987). No entanto, Dereure *et al.* (2000, 2003) encontraram uma seroprevalência de 42.9% de infecção em 35 animais analisados, num foco endémico de leishmaniose visceral humana, no Sudão oriental, admitindo-se a hipótese de que o cão actue como reservatório.

Leishmania infantum Nicolle, 1908 é o agente etiológico da LV zoonótica na China e Ásia Central, África Oriental, Médio Oriente, no Sul da Europa, Norte de África (países da bacia mediterrânea), e na América do Sul, sendo uma infecção emergente em cães na América do Norte (Rosypal *et al.*, 2003; Duprey *et al.*, 2006). No continente americano, o agente responsável pela LV é *Leishmania chagasi*, Cunha e Chagas, 1937. Contudo, estudos de genética evolutiva indicam que aquela espécie é indistinta de *L. infantum*, admitindo-se a hipótese de o parasita ter sido introduzido na América, durante a colonização, através de cães infectados (Dedet, 1993; Maurício *et al.*, 2000). *L. infantum* atinge preferencialmente crianças até aos cinco anos de idade, enquanto *L. donovani* pode infectar adultos de qualquer idade.

O reservatório silvático das espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose visceral é constituído por canídeos selvagens como o chacal (Latyshev *et al.*, 1951; Lubova, 1973), o lobo (Richardson, 1926; Petrisceva, 1961; Rebêlo, 1993; Beck *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008), e a raposa (Rioux *et al.*, 1968; Bettini *et al.*, 1980; Iniesta *et al.*, 1982; Abranches *et al.*, 1984; Dipineto *et al.*, 2007; Sobrino *et al.*, 2008). Segundo a teoria de Garnham (1965) Inicialmente a leishmaniose era uma zoonose de animais silváticos, e o seu ciclo de vida era mantido por flebótomos zoofílicos. O homem e o cão entraram neste ciclo ao penetrarem nas zonas endêmicas para caçar, enquanto os animais silváticos entraram nos povoados em busca de alimentos. Assim, o cão passou a ser o reservatório doméstico de *L. infantum* responsável pela leishmaniose visceral humana.

Embora os roedores sejam considerados os principais reservatórios dos parasitas responsáveis pelas formas de leishmaniose cutânea, o rato preto foi

identificado também como potencial reservatório de estirpes causativas da infecção visceral, podendo até desempenhar um papel importante na transmissão da infecção (Bettini *et al.*, 1980; Pozio *et al.*, 1981).

Na LV, o parasita invade particularmente o baço, o fígado, a medula óssea e os gânglios linfáticos. A doença apresenta aspectos clínicos e biológicos homogêneos nos diferentes focos, caracterizando-se por febre, hepatoesplenomegalia e hiperproteinemia. A anemia e a leucopenia constituem outros parâmetros biológicos frequentes. A evolução da doença é progressiva, podendo ser fatal, se não for tratada. No subcontinente indiano e África Oriental, nomeadamente no Sudão, podem por vezes surgir lesões cutâneas, meses ou anos após a cura clínica da doença sistémica. Estas lesões leishmanídes dérmicas pós kala-azar, por conterem parasitas são importantes na manutenção da endemia da antroponose. Outro factor a ter em conta na perpetuação do ciclo antroponótico é a presença frequente do parasita no sangue durante a doença.

Na maioria dos focos clássicos, a LV manifesta-se de forma endémica. Por vezes, contudo, a infecção por *L. donovani* pode resultar em graves epidemias com uma taxa de mortalidade elevada; no Sudão têm-se verificado graves epidemias desde o início da década de 90 (Ashford *et al.*, 1992), onde cerca de 100 mil indivíduos morreram (WHO, 2000). Por outro lado, em alguns países da bacia mediterrânea (Espanha, França, Itália e Portugal), apesar de não se verificarem epidemias, o surgimento de novos factores imunossupressores, dos quais a infecção pelo HIV é o mais importante, tem contribuído significativamente para o aumento do número de casos de infecção por *L. infantum*, principalmente em adultos (WHO, 1995; Desjeux, 1996).

Nos casos de LV em situações de imunodepressão, as manifestações clínicas atípicas são frequentes, com o envolvimento de tecidos e órgãos que não são usualmente atingidos, tais como a pele, sangue periférico, aparelho digestivo. Adicionalmente, indivíduos infectados pelo HIV e crianças imunocompetentes mas, provavelmente, com uma maior susceptibilidade genética, podem desenvolver uma doença visceral mesmo quando infectados por estirpes dermatópicas (Campino *et al.*, 1994; Benikhlef *et al.*, 2001).

4.4. Leishmanioses em Portugal

Em Portugal, o primeiro caso de leishmaniose foi descrito por Dionisio Alvares em 1910, numa criança de 9 anos de idade, residente em Lisboa. No ano seguinte, Alvares & Silva apresentaram o resultado de um inquérito em 300 cães da região de Lisboa, dos quais oito apresentavam leishmanias (Alvares & Silva, 1911).

A partir de 1951, devido ao aumento da incidência da leishmaniose por todo o país (1616 casos), o kala-azar passou a fazer parte das doenças de notificação obrigatória (Azevedo, 1960). Em 1952, Ramos & Farinhote apresentaram um trabalho de revisão em que foram evidenciadas duas zonas endémicas, o Alto Douro e o Vale do Sado. Entre os anos 50 e o fim dos anos 70, Fraga de Azevedo e os seus colaboradores realizaram diversos estudos epidemiológicos, que realçaram a importância do cão e do flebotomo no ciclo biológico do parasita (Azevedo & Teixeira, 1947; Azevedo & Neves, 1963).

A partir de 1980, Abranches e Pires dão continuidade àqueles estudos, realizando inquéritos, focados no reservatório e no vector, em três regiões: Alcácer do Sal, Região Metropolitana de Lisboa e Região do Alto Douro. Destes estudos ressalta-se o conhecimento de extinção do foco endémico de Alcácer do Sal (Abranches *et al.*, 1983), onde o número de casos humanos tinha vindo a diminuir desde os anos 50, após a aplicação de insecticidas clorados nas campanhas de luta contra os vectores da malária que provocaram também a diminuição da densidade dos flebotomos. Em 1986, é descrita a ocorrência de casos de leishmaniose visceral na Região do Algarve desde 1980 (Maio *et al.*, 1986).

A Região do Alto Douro, tem sido o foco mais activo da infecção humana e da infecção canina. Estudos efectuados nesta Região, apontavam para uma prevalência da infecção canina entre 10% e 12.4%, com a localidade de Vale de Mendiz, no concelho de Alijó, a apresentar 37.8% de animais infectados, o valor mais elevado observado nos três inquéritos epidemiológicos realizados entre 1986 a 1989 (Abranches *et al.*, 1992; Abranches *et al.*, 1993; Sampaio-Silva *et al.*, 1993). Em 2000, Cardoso *et al.* (2004) obtiveram uma seroprevalência de 18.7%, sendo a localidade de Castedo a mais atingida (81.1%). Os isolados caninos de *Leishmania* foram identificados por análise isoenzimática, verificando tratar-se de *L. infantum* zimodemo MON-1 sendo o único encontrado na leishmaniose canina (Campino, 1998) até 2002, ano em que foi isolado o zimodemo MON-98 num cão da Região do

Alto Douro (Cardoso *et al.*, 2002). Quanto ao vector, tanto *P. perniciosus* como *P. ariasi* foram encontrados parasitados, sendo *P. ariasi* quatro vezes mais abundante. As estirpes isoladas do vector foram identificadas como *L. infantum* zimodemos MON-1 e MON-24 (Pires *et al.*, 1991).

Na Região Metropolitana de Lisboa verificam-se mais casos de infecções humanas nas zonas urbanas do que nas áreas rurais. Estudos epidemiológicos de leishmaniose realizados nesta região indicaram uma maior prevalência da infecção canina na área rural (8.8 %) do que na área urbana/suburbana (3.8 %) e uma situação inversa na prevalência da infecção humana. Este fenómeno, conhecido por “desvio trófico em meio rural”, pode estar associado à urbanização ou domesticação de focos zoonóticos naturais. Sendo o vector predominantemente zoofílico, o menor número de animais disponíveis nas áreas urbanas torna a população humana mais vulnerável à infecção acidental (Abranches *et al.*, 1983). O Parque Natural da Serra da Arrábida apresentava o valor mais elevado com cerca de 10.9% de animais infectados (Abranches *et al.*, 1987). Num estudo em raposas, realizado nesse mesmo local, foram encontrados infectados 5.6 % de um total de 71 animais estudados, justificando a existência de ciclo silvático semi-autónomo nesta área geográfica (Abranches *et al.*, 1984). Os vectores encontrados nesta região foram *P. perniciosus* e *P. ariasi* (Pires, 1984). Mais recentemente, Cortes *et al.* (2007) realizaram um inquérito epidemiológico canino na área urbana da Grande Lisboa obtendo uma prevalência de 19.2%. Na cidade de Lisboa, Maia *et al.* (2008) realizaram o primeiro inquérito de leishmaniose felina realizado em Portugal e, encontraram DNA de *L. infantum* no sangue periférico em 30.4% dos 23 gatos analisados.

Na Região do Algarve, foram diagnosticados casos pediátricos desde a década de oitenta, sendo a maioria dos diagnósticos positivos da doença registados no concelho de Loulé (Maio *et al.*, 1986; Vicente, 1990). Nos últimos anos não houve nenhum caso registado no serviço de pediatria do Hospital Distrital de Faro. A prevalência da infecção canina encontrada neste concelho do Algarve foi de 7 %, constituindo o segundo foco mais importante do país em leishmaniose canina (Campino *et al.*, 1995). Os estudos de Schrey *et al.* (1989) na região algarvia revelaram a presença de exemplares de *P. perniciosus* infectados por leishmanias. Posteriormente, a identificação de *L. infantum* MON-1 num outro exemplar infectado (Pires, 2000), reunida à baixa prevalência de *P. ariasi* (Pires, 1979), vem confirmar que *P. perniciosus* é a espécie responsável pela transmissão do parasita nesta região.

Em 2006 realizou-se um rastreio nesta região para determinar a seroprevalência da leishmaniose canina e a abundância e papel vectorial dos flebótomos. Detectaram-se 28.78% (28 em 132) de cães com valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania* e com a técnica de PCR detectou-se uma fêmea de *P. perniciosus* infectada com *L. infantum* (Maia *et al.*, 2007a).

Ainda que existam três regiões endémicas mais relevantes, observam-se em todo o país casos esporádicos de leishmaniose (Neves *et al.*, 2007). Num rastreio serológico efectuado à população canina em 14 aldeias do distrito de Évora (Alentejo) foi identificado 3.9% de animais infectados (Semião-Santos *et al.*, 1995).

Em Portugal, tal como nos outros países da bacia mediterrânea, *L. infantum* zimodemo MON-1 é o principal agente responsável pela LV (Campino *et al.*, 2006). No nosso país, a doença tem sido considerada predominantemente infantil, mas verifica-se uma tendência para a diminuição do número de casos em crianças e o aumento da infecção em adultos, principalmente associada a casos de HIV (Campino, 1998). Entre 2000 e 2006 foram diagnosticados laboratorialmente, na Unidade de Leishmanioses do IHMT, 127 novos casos de LV humana, 40 (30 crianças e 10 adultos) dos quais em indivíduos imunocompetentes e 87 (adultos) em doentes imunodeprimidos. Na direcção geral de Saúde (DGS) nos mesmos 7 anos apenas foi declarado um total de 73 casos (34 crianças e 39 adultos) de leishmaniose visceral dos quais 52 pertencem à Região Metropolitana de Lisboa. Estes números provam a sub-notificação da doença, já que, apesar de ser de declaração obrigatória desde os anos 50, os números oficiais dos últimos anos não ultrapassam uma dezena de casos por ano em todo o País. O número de casos de leishmaniose canina tem vindo a aumentar no nosso País, estando incluída, desde 2002, no grupo das infecções de notificação obrigatória durante as campanhas de vacinação anti-rábica

De um modo geral, a LC é uma doença desconhecida em Portugal, mas têm sido descritos casos, desde os anos 40, nas bacias hidrográficas dos rios Douro, Tejo e Sado (Ramos & Farinhote, 1952; Aguiar, 1970; Manso *et al.*, 1998). No entanto, apenas em dois casos autóctones foi identificada a espécie causadora das lesões como *L. infantum* MON-1 e MON-29 (Campino & Abranches, 2002; Campino *et al.*, 2005). Segundo aqueles autores, embora a LC não seja tão frequente em Portugal como em Itália ou Espanha, onde se verificam focos endémicos (Bettini *et al.*, 1990; Sanchez *et al.*, 1996), esta doença deverá deixar de ser encarada como uma doença muito rara.

Embora os parasitas do género *Leishmania* tenham uma estrutura de população clonal, recentemente isolaram-se em Portugal híbridos entre espécies de filogenia divergente, *L. infantum* e *L. major* em indivíduos imunodeprimidos. Estas ocorrências vêm levantar questões relativamente à frequência dos cruzamentos genéticos entre estirpes em condições naturais e sobre a importância epidemiológica dos seus fenótipos na patogenicidade da infecção e resistência aos fármacos (Ravel *et al.*, 2006).

As alterações climáticas que se estão a verificar, nomeadamente o aumento da temperatura com invernos menos rigorosos, poderá ter como consequência uma actividade flebotomínica durante um maior número de meses por ano, aumentando o período de transmissão do parasita, quer ao Homem, quer aos animais, e concomitantemente, a incidência da doença (Calheiros *et al.*, 2006; Dujardin *et al.*, 2008). Estas alterações climáticas e a vinda de imigrantes do Norte de África e do subcontinente indiano, infectados com *L. tropica* e *L. major*, até à data, não identificadas no nosso país, pode conduzir à introdução destas infecções no País. Em Portugal existem os vectores responsáveis pela sua transmissão, *P. sergenti* no caso da *L. tropica* (Afonso *et al.*, 2005), e *P. papatasi* no caso de *L. major* (Pires, 1979).

5. Interação Parasita-Hospedeiro Vertebrado

O largo espectro fenotípico das leishmanioses está dependente da espécie (ou sub-espécie) infectante e da resposta imunitária, que por sua vez depende das características genéticas do hospedeiro.

A invasão do hospedeiro vertebrado por *Leishmania* envolve todas as componentes de defesa do sistema imune humoral e celular. Sendo o parasita obrigatoriamente intracelular, o seu alvo é o macrófago e, apesar dos macrófagos serem células especializadas na fagocitose e destruição de agentes patogénicos, as leishmanias possuem uma série de estratégias que permitem contrariar a actividade dos macrófagos e resistir ao sistema defensivo do hospedeiro (Bogdan *et al.*, 1990b).

5.1. Resistência aos componentes citotóxicos do soro e invasão do macrófago

Antes de entrar no macrófago, os promastigotas inoculados pelo vector entram em contacto com o soro do hospedeiro, ficando sujeitos à sua acção citotóxica, por activação do complemento. As formas promastigotas de cultura em fase logarítmica

de crescimento, não infecciosas, activam o complemento e são rapidamente lisadas pelo soro não imune (Puentes *et al.*, 1988). Pelo contrário, as formas promastigotas metacíclicas, infecciosas, desenvolvem mecanismos que lhes permitem não só bloquear a actividade lítica do complemento, como ainda explorar a capacidade de opsonização e quimiotaxia do mesmo (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

A activação do complemento leva à formação do componente C5a, o qual atrai os macrófagos para a área da infecção, através de um gradiente quimiotáctico (Bray, 1983). Outro efeito da activação do complemento é a opsonização do parasita por fixação da proteína C3b do complemento. O C3b pode funcionar como ligando para os receptores do complemento nos macrófagos (CR), favorecendo assim a entrada do parasita para as células fagocíticas. O C3b pode também favorecer a formação dos complexos C5b-C9, que medeiam a lise da membrana dos parasitas (Mosser & Edelson, 1984).

Todas as espécies e estirpes de *Leishmania* estudadas até ao momento activam o complemento, quer pela via clássica (Pearson & Steigbigel, 1980; Puentes *et al.*, 1988), quer pela via alternativa (Mosser & Edelson, 1984), e esta activação resulta no aumento da internalização dos parasitas no macrófago (Brittingham & Mosser, 1996). De facto, a capacidade de resistência das formas promastigotas metacíclicas à lise pelo complemento não é devida à ausência de ligação e activação do mesmo, parecendo antes estar relacionada com a expressão antigénica de superfície do parasita (Silva *et al.*, 1989). Duas das proteínas mais abundantes na membrana do parasita desempenham um papel crucial nesta resistência: a glicoproteína de 63 kD (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG). A gp63 promove a conversão proteolítica do C3b à sua forma inactiva (iC3b), a qual se mantém opsonítica, mas perde a capacidade de induzir a formação do complexo C5b-C9 (Brittingham & Mosser, 1996). A função do LPG parece ser essencialmente mecânica: a sua forma alongada nos promastigotas metacíclicos parece funcionar como uma barreira física, evitando a inserção dos complexos C5b-C9 (Puentes *et al.*, 1990). Adicionalmente, foi já demonstrado que as leishmanias possuem proteínas cinases que inactivam as fracções do complemento, por fosforilação (Hermoso *et al.*, 1991; Sacerdoti-Sierra *et al.*, 1997).

Em conclusão, a fagocitose de *Leishmania* pelos macrófagos é mediada por proteínas de superfície do parasita, por factores do soro do hospedeiro e por diversos receptores dos macrófagos (Mosser & Brittingham, 1997). Os receptores do complemento CR3 e CR1 parecem ser os mais importantes (Blackwell, 1985; Silva *et*

al., 1989; Brittingham *et al.*, 1995) e embora ambos os receptores participem na adesão promastigota-macrófago mediada pelo complemento, o CR3 parece desempenhar um papel mais importante neste processo sendo provavelmente o receptor predominante na internalização das formas promastigotas metacíclicas nos macrófagos (Rosenthal *et al.*, 1996). Contudo, a observação de que murganhos deficientes em CR3 podem ser infectados por *Leishmania* sugere a ocorrência de mecanismos de ligação directa, possivelmente envolvendo moléculas do parasita e receptores de lectina nos macrófagos (Mosser & Brittingham, 1997).

5.2. Apoptose

A apoptose ou morte celular programada (MCP) foi inicialmente descrita no início dos anos setenta (Kerr *et al.*, 1972), sendo definida pela morfologia celular, com condensação da cromatina, fragmentação nuclear, perda de volume e decomposição celular com formação de corpos apoptóticos destinados a serem eliminados por fagocitose, prevenindo deste modo o desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Apesar da MCP estar relacionada com a homeostase tecidual, o seu papel torna-se relevante na patogénese das doenças ao eliminar células sem despertar uma resposta imune (Ryder *et al.*, 2007).

No caso da leishmaniose, a MCP é considerada um comportamento altruístico apresentado por uma subpopulação de parasitas e indispensável para o estabelecimento e manutenção da infecção (Wanderley *et al.*, 2005; Getti *et al.*, 2008); a ingestão pelos macrófagos de parasitas (promastigotas/amastigotas) em apoptose, os quais apresentam à superfície fosfatidilserina (PS), leva à libertação de TGF- β e IL-10 e inibe a produção de TNF- α e IL-12 (Holzmüller *et al.*, 2006; Zandbergen *et al.*, 2007), suprimindo a activação dos mecanismos efectores da célula hospedeira. A MCP permite ainda controlar o número de leishmanias no interior do macrófago (assim como no vector), de modo a evitar a falta de nutrientes e prevenir a morte dos parasitas (Zangger *et al.*, 2002; Wanderley *et al.*, 2005; Shaha, 2006; Zandbergen *et al.*, 2006; Carmen & Sinai, 2007). A apoptose também parece ser uma alternativa das leishmanias quando expostas a diferentes fármacos (Serenó *et al.*, 2001b; Lee *et al.*, 2002; Sudhandiran & Shaha, 2003; Jayanarayan & Dey, 2005; Mehta & Shaha, 2004; Paris *et al.*, 2004; Verma & Dey, 2004; Alzate *et al.*, 2008).

5.3. Invasão de neutrófilos e de células com capacidade leishmanicida reduzida

Desde a primeira descrição de multiplicação de leishmanias em células fagocíticas mononucleares (Chang & Dwyer, 1976), inúmeros estudos provaram que os macrófagos são as células hospedeiras de *Leishmania* por excelência. Contudo, nos últimos anos verificou-se a importância dos neutrófilos (PMN) no início da infecção; estas células infectadas secretam IL-8, recrutando um maior número de neutrófilos para o local de infecção, sendo estas células também atraídas pelo factor quimiotáctico de *Leishmania* (LCF) (Zandbergen *et al.*, 2002). Uma vez no interior do neutrófilo, os promastigotas sobrevivem à acção do anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) bloqueando a resposta oxidativa (Laufs *et al.*, 2002). Por outro lado, a apoptose dos neutrófilos infectados é retardada pela inibição da acção da caspase-3 (Aga *et al.*, 2002). Em condições normais, o tempo médio de vida dos neutrófilos é de 6 a 10 horas (Squier *et al.*, 1995), enquanto que as células infectadas por *Leishmania* sobrevivem cerca de 42 horas. Este atraso na apoptose, juntamente com a secreção de quimiocinas inflamatórias dos macrófagos 1α (MIP-1 α) e 1β (MIP-1 β), permite a migração das células hospedeiras para o local de infecção (Sunderkötter *et al.*, 1993; Zandbergen *et al.*, 2004). A ingestão dos PMN apoptóticos parasitados pelos macrófagos (Voll *et al.*, 1997; Fadok *et al.*, 1998; Henson, 2004) facilita a sobrevivência e multiplicação de *Leishmania* através de dois mecanismos: (i) os parasitas intracelulares dos PMN não interagem directamente com os receptores do macrófago, evitando que este reconheça o antígeno e se active; (ii) a fagocitose das células apoptóticas silencia em parte a função de fagocitose, através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias: TNF, IL-1 e IL-12 e através do aumento da secreção das citocinas anti-inflamatórias: factor transformador de crescimento beta (TGF- β) e IL-10 (Laskay *et al.*, 2003; Zandbergen *et al.*, 2004; 2007; Laskay *et al.*, 2008). Por outro lado, Peters *et al.* (2008) defendem que uma outra estratégia parasitária é evitar que os macrófagos activem as suas funções microbidas sobrecarregando-os com a eliminação de PMN em apoptose.

Contudo, a capacidade de fagocitose dos mamíferos não é restrita às principais células fagocíticas (macrófagos, monócitos, neutrófilos), não sendo surpreendente a identificação de outros tipos celulares infectados por *Leishmania* (Rittig & Bogdan, 2000). Por exemplo, foi já demonstrado que as células dendríticas da pele (células de Langerhans) são permissíveis à presença do parasita, ainda que não permitam a sua multiplicação (Blank *et al.*, 1996) enquanto que os fibroblastos são importantes na

fase crónica da infecção (Bogdan *et al.*, 2000). A capacidade das leishmanias permanecerem neste tipo de células poderá contribuir para a presença de um número reduzido de parasitas no hospedeiro vertebrado, funcionando como mais uma estratégia de defesa (Bogdan & Röllinghoff, 1998).

5.4. Sobrevivência e multiplicação nos macrófagos

Durante o processo clássico da fagocitose, os lisossomas, que contêm hidrolases, fundem-se com o fagossoma (parasitóforo), que contém o parasita, formando o fagolisossoma. No caso da leishmaniose, vários estudos demonstraram que os promastigotas podem inibir a fusão fagossoma-lisossoma, por acção do LPG (Desjardin & Descoteaux, 1997). A passagem da forma promastigota para a forma amastigota é acompanhada por uma diminuição da expressão do LPG, restabelecendo-se a fusão fagossoma-lisossoma, pelo que as formas amastigotas têm que resistir ao meio ácido rico em proteases do parasitóforo. Um desses mecanismos é a indução de alterações na homeostase do macrófago. Os parasitas promovem o aumento da concentração de Ca^{2+} dentro do macrófago, alterando assim as suas vias de sinalização dependentes do Ca^{2+} . Como consequência, os macrófagos ficam com os mecanismos de resposta a estímulos internos alterados, afectando funções de combate ao parasita, como o choque oxidativo (“oxidative burst”) e a expressão de moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) da classe II (Eilam *et al.*, 1985; Olivier *et al.*, 1992; Gregory & Olivier, 2005).

Contrariamente às formas promastigotas não infecciosas, as formas metacíclicas não estimulam o choque oxidativo, principalmente devido a dois factores: (1) utilização do receptor CR3 para internalização no macrófago, um processo que não estimula o choque oxidativo (Mosser & Edelson, 1987); (2) a elevada capacidade do LPG na inibição da proteína cinase C do macrófago, a qual é essencial para a produção de metabolitos oxidativos no macrófago (McNeely & Turco, 1990). As formas amastigotas possuem ainda substâncias, como a fosfatase ácida, e outras enzimas (como a superóxido dismutase), que neutralizam os metabolitos oxidativos (Ghosh *et al.*, 2003; Olivier *et al.*, 2005; Kima, 2007).

Um outro mecanismo utilizado pelo macrófago para destruição dos parasitas é a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima NO sintetase (iNOS). Proudfoot *et al.* (1995; 1996) descreveram que a síntese de NO pode ser inibida por moléculas de glicoinositolfosfolípidos (GIPL) e pelo LPG presentes na membrana celular de

Leishmania. Estas duas moléculas, juntamente com a gp63, medeiam a resistência do parasita à acção das hidrolases lisossomais (Sorensen *et al.*, 1994; Opat *et al.*, 1996; Seay *et al.*, 1996).

As formas amastigotas estão perfeitamente adaptadas ao meio ácido dos fagolisossomas: a entrada de metabolitos essenciais, como a prolina, a glucose e as bases pirimidínicas, sendo dependente do transporte de protões (H^+) para o exterior, é óptima a um pH ácido (4.0 – 5.5). Assim, apesar de viverem no meio ácido dos fagolisossomas, os parasitas conseguem manter um pH neutro no seu interior (Burchmore & Barret, 2001).

A multiplicação dos parasitas é seguida de ruptura da célula parasitada, sendo as formas amastigotas fagocitadas por outros macrófagos. A infecção por *Leishmania* induz a expressão de MIP-1 α e MIP-1 β , as quais induzem o recrutamento de mais monócitos/macrófagos para o local da infecção, possibilitando, assim, a disseminação do parasita (Buates & Matlashewski, 2001). Outros estudos demonstraram ainda que o parasita tem a capacidade de inibir a apoptose dos macrófagos infectados, contribuindo assim para a sua própria sobrevivência (Moore & Matlashewski, 1994; Lüder *et al.*, 2001).

5.5. Modulação da resposta imune

As leishmanioses têm sido referidas como modelo da resposta imunitária contra as infecções provocadas por parasitas intracelulares (Roitt *et al.*, 1996).

As interacções *Leishmania*-macrófago determinam a resposta imunitária e têm um forte impacto no desenvolvimento ou na supressão da doença. Macrófagos activados, células “natural killer” (NK) e linfócitos T desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania*. A activação destas células efectoras está dependente da presença de citocinas estimuladoras ou inibitórias. As leishmanias têm a capacidade de alterar a produção das citocinas, afectando, deste modo, o desenvolvimento de uma resposta imune protectora pelo hospedeiro.

A infecção por *Leishmania* pode resultar em dois tipos de respostas imunitárias, associadas à actividade dos linfócitos: a resposta humoral, não protectora, associada com a susceptibilidade à doença, e a resposta celular, promotora da resistência à infecção.

Na LV observa-se uma marcada resposta humoral, com produção de elevados níveis de gamaglobulinas, principalmente IgG e IgM. Algumas delas representam

anticorpos específicos, enquanto outras são resultantes da activação policlonal das células B (Raziuddin *et al.*, 1992). No entanto, os elevados valores de anticorpos não impedem a progressão da doença e estão associados a uma profunda diminuição da imunidade celular (Rezai *et al.*, 1978; Dunan *et al.*, 1990). No cão, os imunocomplexos estão presentes em grande quantidade, provocando lesões que constituem a principal causa de morte, por insuficiência (Slappendel, 1988; Garcia-Alonso *et al.*, 1997). A elevada produção de imunoglobulinas favorece o parasita porque, ao aumentar a opsonização, facilita a sua internalização nos macrófagos, por fagocitose.

Um número considerável de estudos aponta que, em ambas as formas da doença, visceral e cutânea, o desenvolvimento de resistência ou de susceptibilidade à infecção é determinado pela imunidade celular (Liew, 1990).

Os hospedeiros vertebrados possuem um conjunto de moléculas que se ligam a péptidos antigénicos, de forma a que estes sejam reconhecidos pelo sistema imune. Estas moléculas fazem parte do MHC. No macrófago, as moléculas da classe II, associadas a péptidos parasitários provenientes de compartimentos celulares ácidos, posicionam-se na membrana externa, de forma a serem reconhecidos pelas células T, sinalizando, deste modo, a existência da infecção intracelular (Paul, 1993).

Ao reconhecerem o antígeno que lhes é apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), as células T CD4⁺ ficam activadas e produzem citocinas. Existem três tipos principais de APCs: macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Destas, as células dendríticas são consideradas as APCs por excelência, por produzirem constitutivamente níveis elevados de moléculas MHC II, ao passo que nos macrófagos aquela expressão só é induzida na presença de citocinas, como o interferão gama (IFN- γ). No entanto, os macrófagos parecem ser as únicas células tipicamente fagocíticas que também possuem capacidade de apresentação antigénica (revisto por Gomes-Pereira, 2003).

Na interacção entre APCs e linfócitos, para além dos complexos formados pelas moléculas MHC I e II associadas aos péptidos antigénicos, participam também as moléculas de co-estimulação B7-1 e B7-2. Estas moléculas, localizadas na superfície dos APCs, são reconhecidas pelos receptores CD28 (sinal de co-estimulação positiva) e CD152 (CTLA-4, sinal de co-estimulação negativa) das células T. Após estimulação, as células T CD4⁺ podem diferenciar-se funcionalmente em duas subpopulações, T “helper” 1 (Th1) e T “helper” 2 (Th2). As células Th1 e Th2

diferenciam-se a partir de precursores Th “naive” (sem experiência prévia de contacto com antígenos), em resposta a citocinas. A interleucina 12 (IL-12), produzida pelos macrófagos e células dendríticas, é essencial para o desencadear de uma resposta do tipo Th1, enquanto a IL-4 direcciona o desenvolvimento da sub-população Th2. Estas sub-populações diferem no padrão de citocinas produzidas e, consequentemente, na sua função. As células Th1 produzem IL-2, IFN- γ e TNF- α e estimulam a imunidade celular, resultando na activação dos macrófagos e de células T CD8+ citotóxicas e subsequente morte dos parasitas. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, as quais inibem a activação dos macrófagos e são as principais responsáveis pelo desenvolvimento da resposta humoral não protectora (Lehmann & Alber, 1998; Bogdan & Röllinghoff, 1999).

Adicionalmente, ambas as sub-populações de células Th1 e Th2 induzem a produção de anticorpos. *In vitro*, as células Th2 são mais eficientes, promovendo uma indução específica e inespecífica ao antígeno (Liew & O'Donnell, 1993), enquanto as células Th1 apenas promovem a produção de anticorpos nas respostas secundárias específicas ao antígeno. Outra diferença entre as duas sub-populações celulares relativamente à produção de anticorpos é a capacidade de estimular os linfócitos B a produzirem diferentes tipos de imunoglobulinas. A produção de IFN- γ pelas células Th1 e de IL-4 pelas células Th2 estimulam as células B para a produção de IgG2a e de IgG1 e IgE, respectivamente (Finkelman *et al.*, 1990).

Em experiências efectuadas com murganhos infectados por *L. major*, verificou-se que a resposta das células Th1 está relacionada com o controlo da infecção, enquanto que o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 está associada ao desenvolvimento incontrolado da doença (Locksley *et al.*, 1987; Scott *et al.*, 1988; Heinzel *et al.*, 1989; 1991). No entanto, infecções experimentais de murganhos com espécies viscerotrópicas de *Leishmania*, como *L. donovani*, sugerem que a susceptibilidade está mais associada com o desenvolvimento de uma deficiente resposta do tipo Th1 do que com uma resposta dominante do tipo Th2 (Kaye *et al.*, 1991).

A IL-12, para além de promover directamente a expansão das células Th1 e a produção de IFN- γ , desempenha também um papel importante na indução da produção de IFN- γ pelas células NK, as quais participam na resposta imune precoce inespecífica à invasão dos agentes patogénicos, contribuindo assim para o

desenvolvimento inicial de uma resposta Th1 (Scharton & Scott, 1993; Gregory & Olivier, 2005). Estudos de infecção experimental por *L. major* no modelo murino demonstraram que a IL-12 pode ainda suprimir a produção de IL-4 por um mecanismo independente do IFN- γ (Wang *et al.*, 1994).

Contrariamente, as citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- β , parecem contribuir para o estabelecimento da infecção. Macrófagos infectados por *Leishmania* tendem a aumentar a produção daquelas citocinas, conduzindo a uma diminuição da sua capacidade leishmanicida (Barral *et al.*, 1993; Bogdan & Nathan, 1993; Stenger *et al.*, 1994). Estas citocinas são também produzidas por uma sub-população de linfócitos T CD4+, as célula T reguladoras (T_{reg}), as quais são responsáveis pela atenuação, ou mesmo supressão, das respostas imunes do tipo Th1 e Th2, tendo esta resposta sido denominada de Th3. Estas células são importantes para a manutenção da homeostasia imunológica, mas favorecem a sobrevivência do parasita (Belkaid *et al.*, 2002).

Na fase aguda da doença, os doentes com leishmaniose visceral (LV) não apresentam respostas de hipersensibilidade retardada específicas para *Leishmania*, desenvolvem títulos elevados de anticorpos específicos, e os seus linfócitos, *in vitro*, não respondem ao antígeno parasitário. Após a cura, as respostas linfoproliferativas são restabelecidas, produzindo citocinas na presença de antígenos do parasita (Carvalho *et al.*, 1985; 1994). Vários estudos *in vitro* vieram sugerir que a resposta imune na LV é de natureza mista (Cillari *et al.*, 1995; Sundar *et al.*, 1997; Zijlstra & el-Hassan, 2001), isto é com produção concomitante de citocinas Th1 e Th2, tendo também sido detectada *in vivo* a expressão simultânea de IFN- γ e de IL-10, nomeadamente em material de biópsias de doentes com doença activa (Karp *et al.*, 1993; Kenney *et al.*, 1998). Contrariamente ao descrito na LV, na leishmaniose cutânea observa-se uma forte hipersensibilidade retardada e as respostas linfoproliferativas ao antígeno ocorrem tanto durante a doença, como após a cura. O padrão de produção de citocinas varia de acordo com a espécie infectante mas, de uma forma geral, o desenvolvimento das lesões cutâneas está associado à produção de IL-10 (Rocha *et al.*, 1999) e de IL-13 (Bourreau *et al.*, 2001), enquanto a fase de regressão da doença está associada à produção de IFN- γ e diminuição da IL-10, quer em indivíduos em tratamento (Rocha *et al.*, 1999), quer em indivíduos resistentes que vivem em áreas endémicas (Carvalho *et al.*, 1995). Na leishmaniose mucocutânea

(LMC), as respostas linfoproliferativas *in vitro* e *in vivo* (teste de Montenegro) são exageradas, o que pode explicar a destruição dos tecidos do hospedeiro e a escassez de parasitas nas mucosas, característicos nesta doença (Reed & Scott, 1993). A análise da expressão de citocinas nas lesões de indivíduos com LMC sugere o desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2, com produção de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993).

Contudo, a presença ou ausência de citocinas não será o único factor que modula a resposta imune na leishmaniose. Muitos outros factores podem influenciar o desenvolvimento de uma ou de outra sub-população após a infecção, nomeadamente o tipo de células apresentadoras de antígeno (APCs) (Will *et al.*, 1992; Konecny *et al.*, 1999), a natureza dos antígenos reconhecidos (Skeiky *et al.*, 1995) e diferenças nas interações entre as moléculas do MHC II e receptor das células T (TCR) (Kaye *et al.*, 1992).

Os parasitas podem impedir a indução de uma resposta Th1 protectora pelo bloqueio da apresentação de antígenos pelo MHC II; sem a devida apresentação, as células da sub-população Th1 não podem ser eficazmente activadas. Foi já demonstrado que as formas amastigotas de *L. amazonensis* conseguem internalizar moléculas da classe II do MHC nos lisossomas parasitários (megassomas), onde são degradadas pela acção de proteases (Souza-Leão *et al.*, 1995). Por outro lado, o sequestro destas moléculas e dos antígenos dos amastigotas no fagolisossoma foi observado por Lang *et al.* (1994) e Kima *et al.* (1996), respectivamente. Ao regular o processamento dos seus antígenos, o parasita dificulta a detecção de macrófagos infectados, pelo sistema imune do hospedeiro, aumentando assim a sua capacidade de sobrevivência. Adicionalmente, o parasita tem também a capacidade de alterar, nos macrófagos, a expressão de moléculas de co-estimulação indispensáveis para uma eficiente activação das células T. De facto, foi já observada uma redução da expressão das moléculas B7 em células parasitadas (Kaye *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 1995; Pinneli *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003) assim como das moléculas CD40 (Kamanaka *et al.*, 1996; Soong *et al.*, 1995). Este mecanismo poderá estar associado à activação das moléculas de co-estimulação negativa, como o receptor CTLA-4, levando ao bloqueio do processo normal de activação das células T, que pode resultar na morte da célula por apoptose. Alguns estudos demonstraram a ocorrência de apoptose nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ em animais infectados por *Leishmania* (Das *et al.*, 1999; Bertho *et al.*, 2000), sendo o LPG do parasita apontado como potencial

responsável pela regulação deste mecanismo (Wolday *et al.*, 1999). Também a gp63 parece interferir negativamente com a estabilidade das interações entre APCs e células T CD4⁺ (Locksley *et al.*, 1993).

Também as células NK parecem desempenhar um papel fundamental na leishmaniose cutânea. Estudos com *L. major* identificaram uma maior actividade das células NK durante a infecção de murganhos resistentes à infecção do que em murganhos sensíveis. Estas células constituíram uma importante fonte de IFN- γ no princípio da infecção, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1. A remoção destas células induziu uma diminuição da produção de IFN- γ e menor capacidade de eliminação do parasita (Laskay *et al.*, 1995; Scharton & Scott, 1993). Os mesmos autores verificaram, mais tarde, que a activação das células NK em BALB/c infectados por *L. major* era inibida pela presença de TGF- β , possivelmente através de um mecanismo de inibição da produção de IL-12 ou da expressão dos receptores para esta citocina (Laskay *et al.*, 1997; Scharton-Kersten *et al.*, 1995).

Em conclusão, as leishmanias parecem possuir moléculas fortemente imunogénicas, com capacidade de induzir o sistema imune do hospedeiro a desenvolver uma resposta ineficaz, caracterizada pela produção de elevados níveis de anticorpos e respostas celulares específicas diminuídas (Reed & Scott, 1993).

5.6. Regulação genética da infecção

O uso de murganhos geneticamente diferentes ao nível de um gene ou alelo, tem permitido a análise de vários *loci* do hospedeiro, alguns dos quais contribuem de forma decisiva para a evolução da infecção. Os loci *Nramp1* (“Natural resistance-associated macrophage protein 1”) e *H-2* (“Mouse major histocompatibility”) no modelo murino têm sido descritos como determinantes no controlo da LV (Blackwell, 1996).

O locus *Nramp1* manifesta a sua actividade principalmente ao nível da resposta inata do hospedeiro, enquanto que o locus *H-2* intervem na resposta imunológica adquirida contra *Leishmania*.

Nos murganhos, o locus *Nramp1* é responsável pela codificação de uma proteína de membrana do fagossoma que transporta metais divalentes tais como o ferro. A depleção destes catiões, essenciais à actividade metabólica do parasita, inibe

a sua multiplicação intracelular (Skamene *et al.*, 1998; Lipoldová & Demant, 2006). Segundo Searle *et al.* (1998), a expressão deste gene ocorre em macrófagos e monócitos e em leucócitos polimorfonucleares apresentando uma grande variedade de efeitos que incluem a regulação: (i) das citocinas IL-1 e TNF- α ; (ii) da enzima iNOS e da produção de NO; (iii) da expressão de moléculas MHC II e (iv) da apresentação antigénica (Blackwell, 1989; Blackwell *et al.*, 1994; Barton *et al.*, 1995).

Deste modo, o gene *Nramp1* influencia a actividade leishmanicida do macrófago e também a expansão das células T CD4⁺ (Lang *et al.*, 1997). No murganho, dependendo do alelo apresentado para este gene o animal é considerado susceptível (*Lshs*) ou resistente (*Lshr*) à infecção por *Leishmania*.

Numa população humana do Sudão, foi recentemente descrita a associação entre polimorfismos do gene *Lsh* e a susceptibilidade à LV (Bucheton *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2003). Também no cão, estudos recentes mostraram que determinados polimorfismos deste gene predominavam nos animais susceptíveis à infecção por *L. infantum* (Altet *et al.*, 2002; Sanchez-Robert *et al.*, 2008).

Para além do papel do gene *Nramp1* no controlo da resposta imunitária à infecção por *Leishmania*, também o locus responsável pela codificação das moléculas MHC, nos murganhos designado por locus *H-2*, é decisivo na progressão para a cura na LV. No Homem e o cão foram também efectuados estudos para determinação da importância de polimorfismos do MHC na susceptibilidade ao parasita. A tipagem de antígenos HLA (“Human leucocyte antigen”) em doentes com leishmaniose visceral no Irão revelou uma associação da doença ao antígeno HLA-A26 (Faghiri *et al.*, 1995). Barbier *et al.* (1987), Lara *et al.* (1991), Petzl-Erler *et al.* (1991), Cabrera *et al.* (1995) detectaram polimorfismos genéticos nos genes codificantes HLA-I e HLA-II afectando a susceptibilidade a *L. guyanensis* e *L. braziliensis*. Contudo, estudos posteriores na Índia, no Brasil e na Região Mediterrânica, não evidenciaram qualquer associação entre a susceptibilidade à doença e os haplótipos HLA estudados (Singh *et al.*, 1997; Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2002). No Brasil, um estudo recente efectuado em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, revelou uma associação entre a susceptibilidade à leishmaniose canina e polimorfismos do locus DLA4 (“Dog Leukocyte Antigen”) da região génica responsável pelas moléculas MHC II (Quinnell *et al.*, 2003).

Num estudo realizado na Venezuela, Cabrera *et al.* (1995) associaram o aparecimento da LMC com polimorfismos nos genes TNF- α e TNF- β , enquanto que

no Brasil, Karplus *et al.* (2002) associaram-nos ao desenvolvimento de doença por *L. chagasi*. No Sudão, Mohamed *et al.* (2003) e Blackwell *et al.* (2004) encontraram associações entre polimorfismos nos genes codificantes da IL4 e o aparecimento da LV e entre polimorfismos no receptor do IFN- γ e o desenvolvimento de lesões leishmanóides dérmicas pós kala-azar. Mais recentemente, El-Safi *et al.* (2006) associaram o locus 22q12 com desenvolvimento de LV.

A susceptibilidade do hospedeiro é ainda influenciada por factores não-genéticos tais como o grau de nutrição, a presença de infecções concomitantes e a prévia exposição à infecção por *Leishmania* (Baneth *et al.*, 2008).

6. Métodos de Diagnóstico Laboratorial das Leishmanioses

O diagnóstico precoce da leishmaniose é de elevada importância, de forma a evitar o desenvolvimento de lesões graves ou mesmo a morte do doente (Schallig & Oskam, 2002) e como medida de controlo.

O diagnóstico definitivo da doença é efectuado pela identificação do parasita nas lesões de pele e nos órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico, respectivamente nos casos de LC e de LV.

O diagnóstico clínico da LV é complexo, devido à ocorrência, nas mesmas áreas geográficas, de outras doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes, tais como a tripanossomose, a tuberculose e doenças linfoproliferativas. Algumas destas doenças podem cursar concomitantemente com a LV e a sequestração do parasita no baço, no fígado, na medula óssea e nos gânglios linfáticos dificulta o diagnóstico (Sundar & Rai, 2002).

Os métodos de diagnóstico são, basicamente os mesmos, quer se trate da doença humana ou canina.

6.1. Diagnóstico parasitológico

Os métodos clássicos do diagnóstico parasitológico da leishmaniose consistem na pesquisa dos parasitas por exame directo ou por exame cultural, efectuados a partir do material biológico infectado. Na maior parte dos casos de LV, é efectuado a partir de biópsia da medula óssea, e, no caso do cão, também a partir de punção dos gânglios linfáticos. Em alguns casos são utilizadas amostras biológicas de biópsias aspirativas hepáticas e esplénicas, no entanto a recolha de material apresenta maior

dificuldade e um risco acrescido para o doente (Guerin *et al.*, 2002). Os exames de pele também são utilizados para diagnóstico, mas sobretudo na LC.

O exame directo consiste na observação, ao microscópio óptico, de preparações do material biológico, após coloração. A visualização de uma só célula parasitada é patognomónica da infecção por *Leishmania*.

O exame cultural é mais sensível que o exame directo, aumentando assim a probabilidade de sucesso do diagnóstico (Figura 1.5).

Figura 1.5. Meio de cultura NNN.



Apesar de apresentar 100% de especificidade, a obtenção do resultado é demorada e condicionada pela ausência de contaminação bacteriana ou fúngica das culturas. É também necessário ter em conta que nem todos os isolados crescem em meio de cultura e que um resultado negativo com suspeita clínica não significa que o animal não se encontre infectado pois a distribuição dos parasitas nos tecidos e nos diferentes órgãos não é homogénea. Porém, o isolamento da estirpe em meio de cultura possibilita: (1) a identificação da estirpe por tipagem isoenzimática ou molecular, dado que as espécies de *Leishmania* são morfologicamente indistinguíveis; (2) a obtenção de um número suficientemente elevado de organismos para inoculações em infecções experimentais e para obtenção de antígenos; (3) estudos *in vitro* da eficiência de fármacos. Assim se compreende que este exame não seja utilizado sistematicamente para avaliar a resposta terapêutica e os resultados de programas de controlo e erradicação da doença (Ambroise-Thomas, 1976).

Ainda que a visualização de um único parasita seja suficiente para o diagnóstico definitivo da doença, a sensibilidade dos testes parasitológicos é baixa.

6.2. Diagnóstico seroimunológico

Como acima referido, o diagnóstico definitivo da LV é geralmente baseado na detecção do parasita. No entanto, o processo de colheita é invasivo e as técnicas pouco sensíveis (Coppola *et al.*, 1994; Piarroux *et al.*, 1994; Schallig & Oskam, 2002; Sundar & Rai, 2002). Devido a estas limitações, foram desenvolvidos métodos seroimunológicos para diagnóstico da infecção, os quais tiram partido da elevada produção de anticorpos na leishmaniose visceral (Sundar & Rai, 2002), principalmente em indivíduos imunocompetentes e nos cães.

Os métodos seroimunológicos não têm valor prático no diagnóstico das LC. Com excepção da LMC, os anticorpos apresentam valores baixos.

6.2.1. Imunidade humoral

O teste seroimunológico que tem sido universalmente utilizado no estudo da LV é a imunofluorescência indirecta (IFI) (Oddo & Cascio, 1963; Abranches, 1984). Esta técnica semi-quantitativa permite também seguir a infecção, discriminando a fase aguda duma fase de remissão após tratamento, por detecção da diminuição de anticorpos circulantes (Millesimo *et al.*, 1996; Gradoni, 2002; Manciatì *et al.*, 2002; Alvar *et al.*, 2004).

Barbosa *et al.* desenvolveram em 1973 a técnica de contraimmunoelectroforese (CIE) que, apesar de não ser quantitativa, tem as vantagens de apresentar elevada sensibilidade e especificidade, utilizar quantidades mínimas de antigénio, permitir a obtenção do resultado em pouco tempo e de não necessitar de anticorpo específico, podendo ser testada em diferentes espécies de hospedeiros. Pelas características deste teste, é citado como complemento da IFI em estudos epidemiológicos (Mansueto *et al.*, 1982; Dunan *et al.*, 1987; Abranches *et al.*, 1991; Campino, 1991).

Apesar de revelar uma elevada sensibilidade (100%) e especificidade (90.5%) em indivíduos imunocompetentes, a instabilidade dos reagentes, associado a uma reprodutibilidade pouco satisfatória e ao facto de não permitir distinguir entre a fase aguda e a fase remissiva da doença (Millesimo *et al.*, 1996; Baleeiro *et al.*, 2006) torna-a pouco adequada ao diagnóstico, mas bastante útil no rastreio de casos em

estudos epidemiológicos, em que habitualmente se é confrontado com elevado número de amostras (Safi & Evans, 1989).

Harith *et al.* (1986, 1987, 1989), desenvolveram um teste de aglutinação directa (DAT) com reagentes estáveis, que também pode ser utilizada em grande escala e que apresenta resultados de fácil leitura e interpretação. A sensibilidade varia de 70.6 % (Mohebbali *et al.*, 2004b) e 100% (Silva *et al.*, 2006) enquanto que a especificidade encontra-se entre 84.9% (Mohebbali *et al.*, 2004b) e 100% (Neogy *et al.*, 1992; Schallig *et al.*, 2002a).

Uma desvantagem da técnica de DAT é não permitir uma boa distinção entre indivíduos saudáveis e indivíduos em fase de remissão (Millesimo *et al.*, 1996). Apesar de do passado o antigénio utilizado ter que ser mantido a +4°C, a sua liofilização veio colmatar este problema, permitindo a sua manutenção a temperaturas elevadas e a sua utilização em estudos de campo (Neogy *et al.*, 1992; Meredith *et al.*, 1995; Schallig *et al.*, 2002a; 2002b). Schallig *et al.* (2002b; 2004) desenvolveram o teste rápido de aglutinação (FAST), que requer uma única diluição de soro e cuja leitura do resultado é feita após três horas de incubação apresentando uma sensibilidade e especificidade de 93.6% a 97.7% e de 89.0% a 93.0%, respectivamente.

Todas estas técnicas apresentam elevadas sensibilidades quando aplicadas a soros de indivíduos imunocompetentes com LV. No entanto, com o aparecimento de casos de leishmaniose em indivíduos imunocomprometidos, estas técnicas revelaram-se pouco sensíveis, uma vez que estes pacientes apresentam uma resposta humoral reduzida ou mesmo ausência de anticorpos circulantes (Rosenthal *et al.*, 1995; Campino *et al.*, 1997).

Assim, nos anos 90 foi aplicada a técnica de Western-blot no diagnóstico da LV em doentes imunocomprometidos apesar de não haver consenso quanto ao padrão de reconhecimento das fracções proteicas do parasita pelos anticorpos (Mary *et al.*, 1992; Rolland *et al.*, 1994; Marty *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 1996; Santos-Gomes *et al.*, 2000b). A falta de reprodutibilidade dos resultados entre diferentes laboratórios também observada no diagnóstico da leishmaniose canina (Abranches *et al.*, 1991; Carrera *et al.*, 1996; Fernández-Pérez *et al.*, 2003), associada ao elevado custo e à necessidade de ser executada por técnicos experientes, limita a sua utilização à investigação (Ferroglia *et al.*, 2007).

Um dos mais promissores antígenos para aplicação em testes seroimunológicos é o rK39, uma proteína constituída por 39 aminoácidos, predominante nas formas amastigotas do complexo *L. donovani* (Burns *et al.*, 1993). A proteína recombinante rK39 foi inicialmente utilizada num teste de ELISA (Qu *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1995; Badaró *et al.*, 1996; Houghton *et al.*, 1998; Rhalem *et al.*, 1999; Scalone *et al.*, 2002; Mettler *et al.*, 2005) e mais tarde num teste imunocromatográfico de aplicação rápida (“dipstick”) (Sundar *et al.*, 1998). Ambos os testes revelaram elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LV e os níveis de anticorpos anti-rK39 diminuíram rapidamente após a cura (Qu *et al.*, 1994; Houghton *et al.*, 1998). Trabalhos posteriores revelaram que o “dipstick” carecia de sensibilidade (Jelinek *et al.*, 1999; Zijlstra *et al.*, 2001) e especificidade (Reithinger *et al.*, 2002; Chappuis *et al.*, 2003). Contudo, num estudo recente, foi comparada a validade de várias técnicas de diagnóstico, incluindo a IFI, DAT e “dipstick”, para o diagnóstico da LV em doentes do Nepal. Tendo como referência os exames parasitológicos, o teste do “rK39 dipstick” revelou uma sensibilidade de 87.4 %, bastante superior à da IFI (28.4 %) e próximo do valor obtido por DAT (95.1 %). Os autores concluíram que o DAT ou o “dipstick” podem substituir os testes parasitológicos no diagnóstico da LV no Nepal, possuindo o “dipstick” a vantagem de ser de mais fácil utilização (Boelaert *et al.*, 2004).

Apesar destes testes imunocromatográficos (Figura 1.6) serem muito utilizados no diagnóstico da leishmaniose canina devido à sua fácil leitura e utilização, permitindo desta forma a rápida intervenção do clínico, é necessário determinar a sua eficácia (Gradoni, 2002).

Um método de detecção de antígeno parasitário pode constituir uma alternativa promissora às técnicas de detecção de anticorpos circulantes, por ser mais específico (Vinayak *et al.*, 1994; Colmenares *et al.*, 1995b) e por permitir o diagnóstico da doença em casos de deficiente produção de anticorpos (como em indivíduos HIV+ e outros estádios de imunossupressão). A detecção de antígenos de *Leishmania* na urina de indivíduos com LV foi realizada pela primeira vez por Kohanteb *et al.* (1987). O teste revelou uma sensibilidade entre 69%, em crianças com menos de 2 anos de idade e 96 %, em indivíduos imunocomprometidos, e especificidade de 100 % com os antígenos a deixarem de ser detectados três semanas após tratamento, sugerindo que o teste possui um bom valor de prognóstico (Attar *et al.*, 2001; Sarkari *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2006).

Figura 1.6. Testes imunocromatográficos: teste protótipo “Lateral-flow test for the diagnosis of dog visceral leishmaniosis” (a.) e teste rK39 (b.).



Em conclusão, nenhum dos métodos seroimunológicos actuais é considerado altamente eficaz e são de reduzida sensibilidade e especificidade em doentes imunodeprimidos, como nos casos de co-infecção *Leishmania*/HIV, devido à baixa, ou mesmo ausente, produção de anticorpos por estes indivíduos (Mary *et al.*, 1992; Campino, 1998). Testes com elevada sensibilidade e especificidade são necessários para evitar os falsos negativos, os quais subestiman o verdadeiro número de indivíduos infectados assim como os falsos positivos, os quais levam ao tratamento desnecessário ou, no caso dos canídeos, à sua eutanásia. A utilização simultânea de duas técnicas seroimunológicas permite uma maior segurança do diagnóstico e a detecção precoce da infecção, reduzindo assim as desvantagens características do diagnóstico baseado na detecção de anticorpos (Kagan, 1979; Campino, 1998; Davies *et al.*, 2003; Campino, 2002).

6.2.2. Imunidade celular

Segundo Fernández-Bellón *et al.* (2005), a determinação de uma resposta celular específica à infecção por *Leishmania* é um indicador de um fenótipo Th1 associado ao control efectivo da infecção e à sobrevivência do hospedeiro canino. Contudo, as técnicas para determinação da imunidade celular não se encontram tão desenvolvidas e standardizadas como as serológicas pelo que não são normalmente utilizadas no diagnóstico.

O teste cutâneo da leishmanina ou teste de Montenegro (1926) permite avaliar a existência de imunidade celular específica na leishmaniose humana, através de uma reacção dérmica de hipersensibilidade retardada. A sua aplicação constitui um importante meio de diagnóstico em estudos epidemiológicos de leishmaniose cutânea sendo utilizada em áreas endémicas (Rab & Evans, 1995; Bryceson, 1996; Satta *et al.*, 1997).

Nas LC o teste torna-se positivo um a três meses após o aparecimento da lesão e pode assim permanecer toda a vida. Na LMC o resultado é geralmente positivo e é considerado de grande importância para o diagnóstico, pois nesta forma de leishmaniose os parasitas são usualmente escassos (Hassan *et al.*, 1995). Na LV o teste é caracteristicamente negativo durante toda a doença activa, tornando-se positivo, em cerca de 80% dos casos, dois anos após cura (Manson-Bahr, 1961; Pearson & Sousa, 1996).

O significado do teste positivo não é claro, reflecte que há uma resposta imunitária retardada tipo IV, mas desconhece-se se o hospedeiro está protegido da infecção (Zijlstra & El-Hassan, 1993).

Nos últimos anos, foram feitas várias tentativas no sentido de aplicar este teste à infecção canina (Pinelli *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2001a; Fernández-Bellón *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2007; Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007a; 2007b). Apesar da fácil execução e baixo preço, as duas principais desvantagens são a leitura 48 a 72 horas após inoculação da leishmanina e os falsos positivos por acção iatrogénica ou por aplicações repetidas no mesmo animal (Fernández-Bellón *et al.*, 2005).

O teste da proliferação linfocitária permite a detecção da imunidade celular *in vitro*, através da estimulação dos linfócitos, com antígenos específicos. O teste tem sido utilizado para caracterizar o tipo de resposta imunocelular à infecção por *Leishmania* na população humana (Carvalho *et al.*, 1992; Rohtagi *et al.*, 1996; Medrano *et al.*, 1997) e canina (Abranches *et al.*, 1991; Pinelli *et al.*, 1994; Cabral *et al.*, 1992; 1998; Cardoso *et al.*, 1998; Leandro *et al.*, 2001; Quinnell *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001a; Santos-Gomes *et al.*, 2003; Fernández-Bellón *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2007; Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007a; 2007b).

Apesar da resposta imunoproliferativa ter sido observada em cães natural e experimentalmente infectados, assintomáticos ou com sinais clínicos, com ou sem

tratamento (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Fernández-Pérez *et al.*, 2003; Rhalem *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1999), esta parece estar intimamente relacionada com o perfil imunitário e genético do hospedeiro e não depender apenas da gravidade da doença.

6.3. Diagnóstico molecular

Os métodos de diagnóstico das leishmanioses até aqui referidos estão sujeitos a variação fenotípica, podendo ser qualitativa e quantitativamente influenciados pela expressão génica ou por rearranjos moleculares. Pelo contrário, o DNA é a única estrutura que geralmente se mantém inalterada durante todo o ciclo de vida do parasita (Barker, 1989).

6.3.1. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

A partir da década de 80 começaram a ser desenvolvidas técnicas de detecção de ácidos nucleicos do parasita para o diagnóstico da leishmaniose (Meredith *et al.*, 1993). A técnica de PCR baseia-se na amplificação do DNA específico pelo uso de sequências iniciadoras a partir dos ácidos nucleicos de uma amostra biológica. A PCR tem vindo a demonstrar elevada sensibilidade na detecção do parasita (Smyth *et al.*, 1992; Van Eys *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 1996; Campino *et al.*, 2000a; Cortes *et al.*, 2004), sendo um dos métodos mais utilizados, não só no diagnóstico, como também na identificação das espécies de *Leishmania* de uma forma rápida, sem recorrer à cultura do parasita (Smyth *et al.*, 1992; Meredith *et al.*, 1993; Schonian *et al.*, 2003).

A sensibilidade e especificidade da técnica depende das sequências iniciadoras, do número de cópias da sequência alvo, do método de extração de DNA, do produto biológico utilizado e do protocolo de PCR (Alvar *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2004; Baneth & Aroch, 2008). A sua sensibilidade tem vindo a aumentar com o uso de sequências iniciadoras que amplificam sequências que possuem mais de uma cópia por célula. No caso da leishmaniose, essas sequências incluem os genes do mini-exão (Hassan *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1996; Katakura *et al.*, 1998), os genes que codificam para a pequena subunidade do RNA ribossómico (SSU rRNA) (Barker *et al.*, 1987; Van Eys *et al.*, 1992), sequências repetitivas do DNA nuclear (Piarroux *et al.*, 1993) e os minicírculos do DNA cinetoplastideal kDNA (Smyth *et al.*, 1992; Campino *et al.*, 2000a; Cortes *et al.*, 2004).

No presente estudo, foram utilizadas as sequências iniciadoras desenhadas para amplificar uma sequência do kDNA de *L. infantum* (Cortes *et al.*, 2004; Rolão *et al.*,

2004a). O sucesso dos métodos que utilizam o kDNA como gene alvo deve-se às suas características únicas: as leishmanias possuem um número limitado de classes de minicírculos (geralmente menos de 12). Na maioria das espécies de *Leishmania*, cerca de 80 % dos minicírculos pertencem a quatro, ou menos, classes principais, o que significa que cada classe é representada por um número elevado de cópias ($> 10^3$) disponíveis para amplificação por PCR ou hibridação com sondas (Barker, 1989). Dos cerca de 800 pb que constituem o minicírculo, cerca de 120 pb correspondem a uma região conservada que contém a origem putativa de replicação (50 pb) e a sequência “universal” onde o RNA é clivado (13 pb). Assim, a região variável (cerca de 680 pb) pode ser utilizada para a discriminação das espécies de *Leishmania* (Barker, 1987; Smith *et al.*, 1989; Bozza *et al.*, 1995; Lambson *et al.*, 2000).

Apesar do seu valor como método de diagnóstico, tem algumas limitações como a possibilidade de detectar parasitas não viáveis e não necessariamente infecções activas (Delgado *et al.*, 1996) assim como não ser uma técnica quantitativa. Entre os métodos desenvolvidos para quantificação dos produtos formados na reacção de PCR destaca-se a PCR em tempo real.

6.3.2. Reacção em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

Na PCR em tempo real, a utilização de compostos fluorescentes permite a quantificação do produto de PCR durante a fase exponencial da reacção e, assim, a monitorização em tempo real da reacção de amplificação. Assim, a qRT-PCR é um método verdadeiramente quantitativo, permitindo quantificar as moléculas de DNA num intervalo de 6 ou 7 logaritmos. É uma técnica de rápida execução e que não requer manipulação pós-PCR, evitando potenciais contaminações com produtos amplificados, e que pode ser aplicada na quantificação de genomas ou em estudos de expressão génica (Bell & Ranford-Cartwright, 2002; Mortarino *et al.*, 2004; Rolão *et al.*, 2004a; Gomes *et al.*, 2008).

Os sistemas de detecção por qRT-PCR podem ser divididos em dois grupos principais: (1) compostos que se intercalam inespecificamente em cadeias duplas de DNA, como o SYBR[®]-Green I, e (2) metodologias de detecção de cadeia simples de DNA, sob a forma de sondas de hidrólise (como as sondas TaqMan[®]).

O sistema de detecção com SYBR[®]-Green é menos dispendioso do que a utilização de sondas e possui uma maior flexibilidade de aplicação por permitir a aplicação de ensaios de PCR previamente optimizados. A maior limitação deste

sistema reside na possibilidade de o SYBR[®]-Green se intercalar, quer nas sequências-alvo amplificadas, quer em produtos inespecíficos, ou dímeros de sequências iniciadoras que eventualmente se formem durante a reacção de PCR, originando erros na quantificação.

Os sistemas que empregam sondas TaqMan[®], monitorizam indirectamente a quantidade de amplicão-alvo presente em cada amostra, em cada ciclo de PCR. Este sistema tira partido da actividade exonuclease 5' da enzima DNA polimerase, a qual hidrolisa a sonda ligada ao amplicão-alvo, resultando na emissão de fluorescência. A sonda possui um fluorocromo em cada extremidade. No seu estado intacto, a fluorescência gerada pelo fluorocromo da extremidade 5' ("Reporter") é absorvida pelo fluorocromo da extremidade 3' ("Quencher"). Durante a reacção de PCR, a DNA polimerase cliva a sonda hibridada, separando o "Reporter" do "Quencher" e a fluorescência emitida pelo "Reporter" em solução é então detectada e registada no aparelho. Uma vez que as sondas não clivadas (não hibridadas) em solução não emitem fluorescência, a quantidade de fluorescência registada é proporcional à quantidade de amplicão-alvo presente em cada ciclo da reacção de PCR.

Vários ensaios de qRT-PCR têm sido desenvolvidos no âmbito da leishmaniose, quer para quantificação dos parasitas, quer para diferenciação das várias espécies.

Nicolas *et al.* (2002a) desenvolveram um sistema de qRT-PCR com SYBR[®]-Green para identificação das principais espécies de *Leishmania* do Velho Mundo: *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* e *L. infantum*. As sequências iniciadoras utilizadas amplificam uma região do kDNA cuja sequência varia de acordo com as espécies analisadas. Da amplificação do DNA das diferentes espécies resultaram produtos de PCR de diferentes tamanhos e, portanto, com diferentes temperaturas de dissociação. Assim, a diferenciação das espécies foi realizada pela análise das curvas de dissociação.

Nos últimos anos tem-se verificado um crescente aumento do número de protocolos de quantificação de leishmanias por qRT-PCR (Nicolas *et al.*, 2002b; Svobodová *et al.*, 2003; Bretagne *et al.*, 2001; Bossolasco *et al.*, 2003; Pennisi *et al.*, 2005; Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007b). Todos os métodos permitem a quantificação num intervalo alargado do número de parasitas. Contudo, a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos é difícil, uma vez que as unidades de quantificação do parasitismo não se encontram padronizadas,

sendo adoptados diferentes métodos e diferentes unidades (parasitas/g tecido, parasitas/órgão, parasitas/ml), o que dificulta a comparação de resultados entre diferentes estudos. Em 2004, Rolão, para obviar as variações na pesagem ou no processo de extracção de DNA das amostras, como para possibilitar a comparação de resultados de carga parasitária entre amostras de tecidos de estrutura sólida (como o baço e o fígado) e de tecidos no estado líquido (como a medula óssea e o sangue periférico), os valores obtidos para cada amostra por “Real-time” TaqMan® PCR, foram normalizados de acordo com a respectiva concentração de DNA, permitindo pela primeira vez a quantificação absoluta de parasitas em biópsias de tecidos.

O qRT-PCR apesar de ser uma técnica com grande potencial, a sua aplicação como método de diagnóstico de rotina é ainda relativamente dispendiosa.

Até ao momento, não foi desenvolvido nenhum método de diagnóstico de elevada sensibilidade e especificidade de execução suficientemente simples e de baixo custo, para utilizar nos centros de diagnóstico nos países em vias de desenvolvimento, onde a leishmaniose é endémica. No entanto, estão já a ser testados novos genes e proteínas, cuja utilização poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos e de novos fármacos e vacinas. É o caso dos “microarrays” de DNA, cuja utilização permite a análise simultânea da expressão de milhares de genes de *Leishmania* e da proteómica que permite o estudo dos alvos terapêuticos e dos mecanismos de resistência (Drummelsmith *et al.*, 2003). No futuro, esta tecnologia poderá identificar genes que codifiquem antigénios possíveis de ser utilizados em testes de diagnóstico.

7. Modelo Animal

As principais funções das infecções experimentais da leishmaniose são: a manutenção *in vivo* de estirpes do parasita; possibilitar o estudo da patogénese e a resposta imunológica; avaliar a eficácia de novos fármacos e produtos vacinais anti-*Leishmania*.

A evolução da infecção experimental em diferentes animais de laboratório está dependente de uma série de factores do próprio animal, do parasita, tais como a virulência, o inóculo (número e forma do parasita), a via de inoculação e de outros factores desconhecidos. A condição de susceptibilidade ou de resistência em cada

animal é controlada por factores genéticos do próprio (Hommel *et al.*, 1995; Gangneux *et al.*, 2000). As infecções mais graves parecem ser obtidas quando se inoculam amastigotas por via endovenosa (Abranches *et al.*, 1991; Campino *et al.*, 2000b). A maior diferença entre as infecções naturais e experimentais está relacionada com o inóculo do parasita. Em condições naturais, o flebótomo introduz dez a 100 promastigotas metacíclicos na derme do hospedeiro, enquanto nas infecções experimentais são geralmente inoculados milhões de promastigotas de cultura ou amastigotas recuperados de animais infectados. Também a via de inoculação utilizada tem influência na evolução da infecção, sendo frequentemente utilizadas em infecções experimentais as vias intradérmica, subcutânea, intracardíaca, intraperitoneal e endovenosa (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Nabors *et al.*, 1995; Leclercq *et al.*, 1996; Wilson & Weinstock, 1996; Bories *et al.*, 1998; Melby *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2003; Rolão *et al.*, 2004b; Rolão *et al.*, 2007). Alguns dos estudos realizados procuraram uma aproximação à infecção natural, procedendo à inoculação de um menor número de promastigotas, após selecção das formas metacíclicas (Belkaid *et al.*, 1998; Compton & Farrell, 2002), inoculados por via intradérmica (Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Santos-Gomes *et al.*, 2000a) ou mesmo a co-inoculação de parasitas com extractos salivares do vector (Titus & Ribeiro, 1988; Samuelson *et al.*, 1991; Theodos *et al.*, 1991; Warburg *et al.*, 1994; Lima & Titus, 1996; Ahmed *et al.*, 2003).

7.1. O Murganho

O murganho (*Mus musculus*) é o modelo mais utilizado no estudo da leishmaniose. As principais vantagens deste modelo são: (1) permitir uma fácil manipulação e acomodação dos animais; (2) permitir trabalhar com estirpes “inbred”, reduzindo as variações genéticas entre animais do mesmo grupo experimental; (3) possibilitar a manipulação genética, criando estirpes resistentes ou susceptíveis à infecção, ou mesmo estirpes “knock-out” para determinados genes; (4) disponibilidade de um elevado número de reagentes imunológicos comercializados.

As várias estirpes de murganhos representam em excelente modelo para o estudo das leishmanias dermatrópicas dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis*. No caso das estirpes viscerais, este modelo já não é tão eficaz devido à necessidade de inocular grandes quantidades de parasitas, o oposto ao que ocorre nas infecções naturais (Requena *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos efectuados neste modelo representam infecções experimentais com *L. major*, por este modelo apresentar fenótipos de susceptibilidade e resistência à infecção reprodutíveis. A infecção por *L. major* tem sido estudada por muitos autores e tem contribuído fortemente para o conhecimento mais aprofundado das leishmanioses, nomeadamente dos mecanismos adoptados pelo parasita para a invasão do hospedeiro e o tipo de resposta imunitária desenvolvida por hospedeiros susceptíveis e resistentes (Liew & O'Donnell, 1993; Reiner & Locksley, 1995; Launois *et al.*, 1998). A inoculação intradérmica com *L. major* resulta no desenvolvimento de uma lesão cutânea, cuja evolução parece depender da predisposição genética da estirpe de murganho utilizada. Estirpes de murganhos resistentes, como os C57BL/6, desenvolvem uma resposta imune celular do tipo Th1, com produção de IL-12 e IFN- γ , enquanto estirpes susceptíveis, como os murganhos BALB/c, desenvolvem uma resposta Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (Locksley *et al.*, 1987; Heinzel *et al.*, 1989; Mosmann & Coffman, 1989; Locksley & Scott, 1991). A associação entre a resistência à infecção e a resposta Th1 é devida à produção de IFN- γ pelas células desta sub-população linfocitária, citocina que activa os macrófagos para a destruição intracelular dos parasitas.

Nas infecções experimentais em murganhos por espécies viscerotrópicas de *Leishmania*, a susceptibilidade à infecção parece estar mais relacionada com uma resposta Th1 insuficiente, do que com uma progressão da resposta Th2 (Kaye *et al.*, 1991). A dicotomia da resposta imunitária Th1 ou Th2, amplamente descrita nas infecções experimentais por *L. major* no modelo murino, também não foi observada observada na infecção por *L. infantum* (Rolão *et al.*, 2007). Os murganhos desenvolveram uma resposta mista do tipo Th1/Th2, com produção simultânea de citocinas associadas a ambos os tipos de resposta imune, no baço e no fígado. Neste modelo experimental, foi verificado que o desenvolvimento do parasitismo e da resposta imune é fortemente influenciado pela via de inoculação utilizada e que o controlo regional nos gânglios linfáticos reflecte-se na ausência de invasão dos órgãos viscerais. Em estudos realizados com *L. donovani*, verificou-se que murganhos infectados com amastigotas, por via subcutânea, não desenvolveram infecção visceral, enquanto a inoculação por via intravenosa resultou no desenvolvimento de hepatoesplenomegalia e aumento da carga parasitária no baço e nos gânglios linfáticos. A inoculação cutânea induziu uma infecção local controlada, associada a

uma resposta específica, *in vitro*, ao antígeno do parasita e aumento de IFN- γ e IL-12 nos gânglios linfáticos. Por outro lado, a infecção visceral resultante da inoculação intravenosa levou a uma inibição, *in vitro*, da resposta celular específica ao antígeno e produção inicial de IL-4, aumento de IL-10 e diminuição da expressão de IL-12, ao nível do baço (Melby *et al.*, 1998).

Considera-se hoje que, em humanos e murganhos, o controlo da infecção requer o desenvolvimento de uma resposta celular do tipo Th1 e que citocinas como a IL-10 e o TGF- β , que influenciam negativamente a resistência à infecção em murganhos, poderão também desempenhar um papel relevante no desenvolvimento de infecções persistentes em humanos. O que se mantém por explicar são as causas da elevada variação individual de respostas à infecção observadas na doença (Farrell, 2002).

7.2. O Hamster

Apesar de nunca terem sido encontrados naturalmente infectados, os hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) constituem um modelo laboratorial muito utilizado no estudo das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas (Ott *et al.*, 1967; Rey *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 1988; Gifawesen & Farrell, 1989; Santos-Gomes, 1995; Bories *et al.*, 1998; Ghose *et al.*, 1999; Requena *et al.*, 2000; Riça-Capela *et al.*, 2003). Os hamsters são, ainda, muito utilizados para a manutenção *in vivo* de estirpes virulentas de *Leishmania* (Hommel *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2004).

A utilização de hamsters no estudo da leishmaniose é vantajosa por os animais serem de fácil criação e manutenção num biotério, constituindo, segundo alguns autores, o único modelo animal de pequeno porte que desenvolve a doença de um modo semelhante à observada em humanos (Kaye, 2002; Requena *et al.*, 2000) sendo muito útil na primeira fase dos ensaios vacinais (Garg & Dube, 2006). A sua utilização como modelo experimental na infecção por estirpes viscerotrópicas é reforçado por várias constatações:

(1) a infecção e progressão da doença são conseguidas com uma pequena quantidade de inóculo aproximando-se dos valores que se estima ocorrerem na infecção natural;

(2) os parâmetros imunológicos e clínicos observados no hamster são semelhantes aos do ser humano e do cão infectados naturalmente. Nas infecções experimentais com *L. donovani* e *L. infantum*, observou-se uma associação entre

parasitismo elevado, títulos elevados de anticorpos e ausência de respostas linfoproliferativas (Evans *et al.*, 1990; Requena *et al.*, 2000; Melby *et al.*, 2001; Riça-Capela *et al.*, 2003). Os animais infectados apresentaram hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e caquexia progressiva. Apesar de uma forte resposta Th1 com produção de IL-2, IFN- γ e TNF no fígado, baço e medula óssea, houve replicação parasitária com progressão da doença. Pensa-se que a susceptibilidade à infecção nestes animais é devida a uma deficiência na fase efectora da resposta imune, nomeadamente uma deficiente indução da iNOS. É possível que o promotor do gene do hamster que codifica para a iNOS tenha características estruturais similares ao da iNOS humana, tornando-a menos susceptível à activação pelo IFN- γ (Melby *et al.*, 2001). Nas infecções experimentais por estirpes dermatrópicas os animais desenvolvem lesões nodulares ou ulcerativas, com disseminação e metastização cutânea (Oliveira *et al.*, 2004)

(3) alguns dos animais infectados desenvolvem uma resposta imunitária protectora. Em estudos com hamsters infectados com número variável de promastigotas de *L. infantum*, Requena *et al.* (2000) verificaram a existência de uma correlação entre a quantidade de parasitas inoculados e a sintomatologia clínica e os parâmetros imunológicos. Contudo, alguns animais desenvolveram uma infecção autolimitante independentemente do tamanho do inóculo, fazendo do hamster um modelo promissor para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos e imunoprolifáticos.

Contudo, o estabelecimento de um modelo experimental com hamsters é dificultado pelo baixo número de imunorreagentes disponíveis no mercado.

7.3. O Cão

O cão (*Canis familiaris*) tem sido usado como modelo experimental para as infecções por *Leishmania* desde o início do século passado (Hommel *et al.*, 1995). A progressão da infecção está associada a uma depressão da imunidade celular e a uma marcada resposta humoral, com elevada produção de imunoglobulinas específicas e inespecíficas. Os anticorpos circulantes anti-*Leishmania* são produzidos precocemente, aumentam com a progressão da infecção e atingem, em geral, valores elevados (Abranches *et al.*, 1991).

A variabilidade da evolução da infecção em cada animal é imprevisível constituindo um dos principais problemas no estabelecimento de modelos experimentais para a leishmaniose canina (Moreno & Alvar, 2002). Cães experimentalmente infectados com o mesmo número de parasitas podem desenvolver infecções sintomáticas, oligossintomáticas ou assintomáticas, variando no teor de anticorpos produzidos, na resposta linfoproliferativa ao antígeno específico ou na produção de citocinas (Pinelli *et al.*, 1994; Leandro *et al.*, 2001). No entanto, este modelo experimental tem a vantagem de reflectir o espectro das respostas clínicas observadas nas infecções naturais destes animais e na leishmaniose visceral humana (Abranches *et al.*, 1991; Pinelli *et al.*, 1994; Martínez-Moreno *et al.*, 1995; Carrera *et al.*, 1996; Nieto *et al.*, 1999; Rhalem *et al.*, 1999; Campino *et al.*, 2000b; Leandro *et al.*, 2001).

As vias de inoculação mais utilizadas na infecção experimental canina são a intradérmica (ID) e a endovenosa (EV) (Quadro 1.2). Apesar da via EV reduzir o período pré-patente (Nieto *et al.*, 1999; Rhalem *et al.*, 1999; Campino *et al.*, 2000b; Moreno & Alvar, 2002), a via ID permite o desenvolvimento de uma resposta imunocelular por alguns dos animais (Moreno & Alvar, 2002; Moreno *et al.*, 2003).

Nos estudos em que se utilizaram amastigotas como inóculo, os sinais clínicos apareceram 2 a 6 meses após infecção (Abranches *et al.*, 1991; Campino *et al.*, 2000b), enquanto que alguns dos animais inoculados com promastigotas permaneceram assintomáticos durante todo o período experimental que variou entre 25 e 50 meses (Oliveira *et al.*, 1993; Campino *et al.*, 2000b; Santos-Gomes *et al.*, 2003). Contudo, a via ID é a que apresenta um menor número de infecções sintomáticas (Abranches *et al.*, 1991; Genaro *et al.*, 1992; Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Pinelli *et al.*, 1994). Apesar de se tentar aproximar o número de parasitas inoculados ao que ocorre na natureza, a reprodutibilidade dos resultados entre os animais do mesmo grupo só é conseguido quando a concentração de parasitas se situa entre 10^8 - 10^9 promastigotas (Moreno & Alvar, 2002; Ramiro *et al.*, 2003; Lemesre *et al.*, 2005; Poot *et al.*, 2005).

Quadro 1.2. Infecções experimentais por *Leishmania infantum* no modelo canino.

Forma parasitária	Via de inoculação	Inóculo	Diagnóstico da infecção	Sinais clínicos	Referência
Amastigotas	EV	10 ¹⁰⁻¹¹ /Kg	Seroconversão	N	Abranches <i>et al.</i> , 1991
			Seroconversão		
		5x 10 ⁷⁻⁹ /animal	Isolamento de parasita em cultura	N	Oliveira <i>et al.</i> , 1993
		10 ⁸ /animal	Seroconversão	N	Binhazim <i>et al.</i> , 1993
		10 ⁵ /Kg	Seroconversão	S	Rhalem <i>et al.</i> , 1999
		5.8 x10 ⁸ /animal	Seroconversão	N	Carrera <i>et al.</i> , 1996
			Seroconversão		
			Isolamento de parasita em cultura		
		10 ⁹ /Kg	PCR	S	Campino <i>et al.</i> , 2000b
		10 ⁶ /Kg	Isolamento de parasita em cultura	N	Leandro <i>et al.</i> , 2001
			Seroconversão		
			Isolamento de parasita em cultura		
		2 x 10 ⁹ /Kg (re-inoculação)	PCR	S	Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2003
			Seroconversão		
		Isolamento de parasita em cultura			
		PCR	S	Strauss-Ayali <i>et al.</i> , 2004; 2005; 2007	
	ID	10 ¹¹ /Kg	Seroconversão	N	Abranches <i>et al.</i> , 1991
Promastigotas	EV	10 ⁶⁻¹⁰ /animal	Isolamento de parasita em cultura	N	Oliveira <i>et al.</i> , 1993
		10 ⁷⁻⁸ /Kg	Seroconversão	N	Abranches <i>et al.</i> , 1991
		5 x 10 ⁷ /animal	Seroconversão	S	Martínez-Moreno <i>et al.</i> , 1995
			Seroconversão		
		2-5 x 10 ⁵ /animal	Isolamento de parasita em cultura	S	Nieto <i>et al.</i> , 1999
			Seroconversão		
			Isolamento de parasita em cultura		
		10 ⁹ /Kg	PCR	N	Campino <i>et al.</i> , 2000b
			Seroconversão		
		10 ⁸ /Kg	Isolamento de parasita em cultura	N	Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2003
		10 ⁸ /animal	Seroconversão	S	Moreno <i>et al.</i> , 2003
			Seroconversão		
			Isolamento de parasita em cultura		
		10 ⁸ /animal	PCR	N	Paranhos-Silva <i>et al.</i> , 2003
		Seroconversão			
	5 x 10 ⁷ /animal	Isolamento de parasita em cultura	S	Poot <i>et al.</i> , 2005	
		Seroconversão			
		Isolamento de parasita em cultura			
	1 x 10 ⁷ - 2 x 10 ⁸ /animal	PCR	S	Rosypal <i>et al.</i> , 2005a	
		Seroconversão			
	5 x 10 ⁷ /animal	qRT-PCR	S	Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2007b	
	ID		Seroconversão		
		5x 10 ⁷ -1.8 x 10 ⁵ /animal	Isolamento de parasita em cultura	N	Killick-Kendrick <i>et al.</i> , 1994
			Seroconversão		
		1.6 x 10 ⁵ /animal	Isolamento de parasita em cultura	S	Pinelli <i>et al.</i> , 1994
			Seroconversão		
10 ⁸ /Kg		Isolamento de parasita em cultura	S	Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2000a	
10 ⁷ /Kg		ND	N	Leandro <i>et al.</i> , 2001	
5 x 10 ⁸ /animal		Seroconversão	N	Moreno <i>et al.</i> , 2003	
		Isolamento de parasita em cultura			
4 x 10 ⁴ /animal		PCR	N	Paranhos-Silva <i>et al.</i> , 2003	
		Seroconversão			
5 x 10 ⁷ /animal		Isolamento de parasita em cultura	S	Poot <i>et al.</i> , 2005	
IP		Seroconversão			
	5x 10 ⁷⁻⁹ /animal	Isolamento de parasita em cultura	N	Oliveira <i>et al.</i> , 1993	

N - Sem sintomatologia; S - Com sintomatologia; EV - Endovenosa; ID - Intradérmica; IP - Intraperitoneal; ND - Não determinado; PCR - Reacção em cadeia da polimerase

7.4. Os Primatas

Os macacos “vervet” (*Cercopithecus pygerythrus*) são considerados por alguns autores um bom modelo experimental visto serem filogeneticamente próximos do homem, e apresentarem, tal como o ser humano, cura espontânea após infecção natural e experimental por *L. major* ou poderem não apresentar sintomas após infecção por *L. donovani*, tal como acontece com o homem nas zonas endémicas. Considera-se que a resistência à infecção, nestes animais, se encontra associada com o aumento da produção de IFN- γ e a uma resposta de hipersensibilidade retardada. Esta espécie tem sido utilizada como modelo para o estudo de candidatos vacinais anti-*L. major* e anti-*L. donovani* (Gicheru *et al.*, 1997, 2001; Masina *et al.*, 2003).

A espécie “langur” (*Presbytis entellus*) foi utilizada para o estudo de vacinas anti-*L. donovani* utilizando uma associação de *L. major* com BCG demonstrando haver protecção heteróloga entre algumas estirpes de *Leishmania* (Dube *et al.*, 1998).

A dificuldade de obter animais, o elevado custo de manutenção, o facto de serem “immunological black boxes” (inexistência de marcadores das células T e elevada variabilidade individual) e problemas éticos, faz com que a sua utilização para testar vacinas seja controversa (Hommel *et al.*, 1995; Garg & Dube, 2006). O facto da infecção por *Leishmania* sp. ser exclusivamente experimental também diminui o seu potencial como modelo (Requena *et al.*, 2000).

7.5. O Gato

Kirkpatrick *et al.* (1984) utilizaram o gato como modelo experimental de *L. infantum* e *L. donovani*. Apesar dos animais terem apresentado títulos elevados de anticorpos, permaneceram assintomáticos durante todo os seis meses de observação. Nos animais inoculados com amastigotas de *L. donovani* por via endovenosa detectaram-se leishmanias no sangue, fígado e baço uma semana após infecção, enquanto que nos animais inoculados com *L. infantum*/*L. chagasi* o parasita só foi detectado um mês após infecção. No grupo de animais inoculados com aquelas espécies, por via intradérmica, não se observaram leishmanias durante todo o período de observação. No entanto, posteriormente o gato doméstico foi considerado refratário à infecção experimental por *L. donovani*. Anjili & Githure, (1993) não detectaram parasitas através do exame directo e cultural nos 180 dias após infecção experimental por via endovenosa.

Simões-Mattos *et al.* (2005) também utilizaram o modelo felino para testar a sua susceptibilidade à infecção por *L. braziliensis*. Duas e quatro semanas após inoculação intradérmica de promastigotas no nariz e na orelha, as principais lesões cutâneas observadas foram pápulas e nódulos cutâneos na orelha inoculada. A disseminação para a outra orelha e linfadenomegalia regional ocorreram às 10 e 11 semanas, respectivamente. Os autores não observaram correlação entre a presença de lesões activas e os títulos de anticorpos. As lesões óticas e nasais acabaram por cicatrizar 32 e 40 semanas após o início do período experimental.

8. Leishmaniose Canina

A leishmaniose canina foi descoberta por Nicolle e Comte, na Argélia em 1908 e desde então têm sido encontrados cães infectados na maior parte das áreas onde a leishmaniose humana visceral, particularmente o kala-azar infantil, é endémico (Rab & Evans, 1995). Em quase todo o mundo, o cão é considerado, o reservatório mais importante da espécie de *Leishmania* causadora da forma visceral da doença.

Apesar de alguns estudos mostrarem uma relação directa entre a prevalência da leishmaniose canina e a leishmaniose visceral humana (Marty *et al.*, 1992), a infecção no cão apresenta valores muito superiores e estende-se por uma área mais vasta quando comparada com a infecção humana (Houin *et al.*, 1977). Embora nem sempre exista uma correlação entre as incidências da infecção canina e da infecção humana, a presença de cães infectados, desempenha um papel importante na manutenção da endemia da leishmaniose visceral humana (Mansueto *et al.*, 1982; Abranches *et al.*, 1986; 1987; Bettini & Gradoni, 1986; Semião-Santos *et al.*, 1995). Existem 3 diferenças fundamentais entre a leishmaniose visceral humana e canina: a cronicidade, que inclui um período pré-patente prolongado; o parasitismo viscerocutâneo e o seu pior prognóstico devido ao tratamento não ser eficaz.

Na natureza nem todos os animais inoculados com promastigotas desenvolvem o quadro clínico. O número de infecções assintomáticas é muito maior que o número de infecções sintomáticas (Campino, 2002). Estudos epidemiológicos efectuados em focos de leishmaniose canina na Europa, revelaram que cerca de metade dos cães parasitados não exibiam sintomatologia, mas apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* (Gradoni *et al.*, 1980; Abranches *et al.*, 1991; Solano-

Galego *et al.*, 2001b) indicando a existência de animais assintomáticos, potencialmente infectantes para o vector (Lanotte *et al.*, 1979; Molina *et al.*, 1994). Por outro lado, infecções caninas experimentais evidenciaram a ausência de anticorpos em animais parasitados (Campino *et al.*, 2000b) o que alerta para os estudos epidemiológicos, que se baseiam apenas na detecção de anticorpos circulantes, podendo subestimar o número de cães infectados (Cabral *et al.*, 1998; Campino, 1998; Alvar *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2008).

8.1. Epidemiologia

Apesar da prevalência da leishmaniose não se encontrar relacionada com o sexo (Ferrer, 1999; Campino, 2002), num estudo efectuado no Sul da Itália (Ciaramella *et al.*, 1997) com 150 cães naturalmente infectados verificaram que a maioria dos animais eram do sexo masculino. De igual modo, apesar de em alguns estudos epidemiológicos (Abranches & Pires, 1980; Campino *et al.*, 1995), as raças mais afectadas terem sido o Pastor Alemão, Boxer e Doberman, não existe predisposição racial embora os animais de caça e de guarda, ao permanecerem no exterior das casas, estejam mais expostos aos flebótomos (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Blavier *et al.*, 2001). A doença atinge animais de todas idades mas, devido ao seu longo período pré-patente, não é frequente em animais com menos de seis meses (Ferrer, 1999; Koutinas *et al.*, 1999). O período de incubação após infecção experimental varia entre um e doze meses, na infecção natural não se sabe qual é a sua duração visto não se saber quando ocorreu a inoculação (Campino, 2002).

8.2. Patogenia e sinais clínicos

A diversidade dos sintomas está relacionada com os vários mecanismos patogénicos desencadeados pelo parasita e pela variação individual das respostas imunitárias. Existem desde formas anérgicas com disseminação generalizada dos parasitas oligossintomática ou mesmo sem manifestações clínicas, até formas hiper-activas nas quais as leishmanias não são detectadas mas os animais apresentam lesões orgânicas significativas e uma sintomatologia grave (Alvar *et al.*, 2004). Os mecanismos patogénicos pelos quais os parasitas de *Leishmania* provoca lesões nos diferentes órgãos incluem infiltrados inflamatórios não supurativos, uma resposta

humoral exagerada e não protectora, e a produção de complexos imunes circulantes (Alvar *et al.*, 2004; Naranjo *et al.*, 2005).

No período pré-patente, as primeiras alterações inespecíficas observadas são: febre, apatia, astenia, alterações no apetite, perda ligeira e constante de peso, conjuntivite, depilações periorbitárias e auriculares e adenomegalia passageira (Cardoso & Cabral, 1998; Alvar *et al.*, 2004). Num quadro clínico típico de leishmaniose canina, o animal apresenta-se abatido, muitas das vezes caquético, anémico, com atrofia dos crotáfita, hipertrofia ungueal, adenomegalia e frequentes alterações cutâneas. Os sintomas apresentam uma evolução lenta e progressiva com pouca ou nenhuma resposta aos antibióticos e glucocorticóides. A imunossupressão provocada pela infecção permite o aparecimento de doenças concomitantes tais como *Ehrlichia canis*, *Demodex canis*, *Sarcoptes scabiei* e *Hepatozoon canis* (Ciaramella *et al.*, 1997).

A inoculação dos parasitas na pele, desencadeia uma resposta inflamatória local caracterizada por uma infiltração de células mononucleadas (predominantemente macrófagos e em menor grau linfócitos e plasmócitos), neutrófilos e eosinófilos (Ferrer, 1999; dos-Santos *et al.*, 2004; Saridomichelakis *et al.*, 2007). Nos animais resistentes, a resposta traduz-se na expressão de moléculas MHC-II pelas células de Langerhans e queratinócitos, pela presença de células T, de macrófagos e de parasitas na derme (Fondevila *et al.*, 1997; Tafuri *et al.*, 2004). Alguns cães desenvolvem uma resposta imunitária eficaz com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Ferrer, 1999) e apesar de estarem infectados permanecem assintomáticos podendo apresentar contudo uns pequenos nódulos cutâneos no local de inoculação (Figura 1.7a); estes “cancros de inoculação” localizam-se normalmente no nariz ou nas orelhas desaparecendo entre 1 a 6 meses de forma espontânea (Ferrer, 1999; Blavier *et al.*, 2001).

Mais recentemente, Ordeix *et al.* (2005) observaram em cinco cães múltiplas lesões papulares eritematosas e firmes dispersas pela cabeça e abdómen. A análise citológica das pápulas mostrou que o número de parasitas era reduzido, provavelmente devido ao desenvolvimento de uma imunidade celular eficiente capaz de controlar a multiplicação parasitária. Como estas lesões cutâneas eram as únicas alterações manifestadas pelos animais, os autores sugeriram que esta era uma forma benigna da doença, teoria suportada pelo facto de que os animais não apresentarem sinais sistémicos nem recrudescências após tratamento.

Nos animais susceptíveis, as lesões caracterizam-se pela ausência de células apresentadoras de antígeno na derme e por um elevado número de leishmanias no interior dos macrófagos (Fondevila *et al.*, 1997; Tafuri *et al.*, 2004). A proliferação exagerada de células inflamatórias intensamente parasitadas também foi observada por Font *et al.* (1996) em nódulos nas mucosas oral e genital. Os animais com sinais cutâneos severos e com uma carga parasitária elevada na pele, apresentam uma resposta local do tipo Th2 (Brachelente *et al.*, 2005). As alterações da pele são as manifestações mais frequentes na leishmaniose canina. As lesões são simétricas, crônicas, não pruriginosas (Slappendel, 1988; Ferrer, 1999). A alopecia localiza-se inicialmente na cabeça, principalmente na região periorbital, focinho e pavilhões auriculares e posteriormente no pescoço, tórax, tuberosidades ósseas e cauda. Esta alopecia é acompanhada de dermatite furfurácea com distribuição localizada no bordo do pavilhão auricular, região periorbital e focinho e de seborreia seca, com início na cabeça estendendo-se para o resto do corpo (Figura 1.7b). O aumento da espessura da pele que se torna seca, dura, rugosa, com perda de elasticidade adquire o aspecto de “paquiderme”. Ulcerações que facilmente sangram, com localização na cabeça, no bordo do pavilhão auricular, região periorbital, focinho e nos membros (particularmente nas articulações) são outras das alterações cutâneas observadas (Figura 1.7c).

Embora menos frequentes, têm sido descritos casos de dermatite pustular estéril, de dermatite nodular, a qual se caracteriza pela presença de múltiplos nódulos cutâneos (com menos de 2cm de diâmetro), dolorosos, não ulcerados e não pruriginosos distribuídos por todo o corpo (Ciaramella *et al.*, 1997; Ferrer, 1999; Koutinas *et al.*, 1999; Blavier *et al.*, 2001) e de dermatite papular (Ordeix *et al.*, 2005). As membranas mucosas (oral, nasal e genital) são ocasionalmente afectadas (Font *et al.*, 1996; Ciaramella *et al.*, 1997).

Nos animais infectados que evoluem para a doença, a disseminação do parasita pelos órgãos parece ser sequencial, iniciando-se no gânglio linfático, seguindo-se o fígado e atingindo posteriormente o baço. A pele dos cães, tal como no caso dos humanos, é afectada numa fase mais avançada (Travi *et al.*, 2001; Tafuri *et al.*, 2004). Esta disseminação pelos órgãos desencadeia uma resposta inflamatória granulomatosa, acompanhada normalmente por um número reduzido de amastigotas (Bourdoiseau *et al.*, 1997).

A esplenomegalia assim como as adenopatias dos gânglios cervicais, submaxilares, pré-escapulares, axilares e poplíteos são dos sinais mais frequentes e constantes (Slappendel, 1988; Abranches *et al.*, 1991; Ciaramella *et al.*, 1997). Os gânglios, à palpação, apresentam um aumento considerável de tamanho e consistência dura. São indolores, não aderentes, lisos e não apresentam sinais inflamatórios. Os seus centros germinativos corticais e medulares, produtores de linfócitos B, encontram-se hiperplásicos e com um elevado número de macrófagos enquanto que a zona paracortical, produtora de linfócitos T, apresenta-se depauperada. Alterações semelhantes são observadas no baço. A leishmaniose canina provoca a desorganização da polpa branca, com poucos linfócitos ao redor da arteríola central e a polpa vermelha apresenta-se hipercelular, com plasmócitos e macrófagos parasitados na zona marginal, e com proliferação das células endoteliais (Tafari *et al.*, 2001). No estudo realizado por Alexandre-Pires *et al.* (2006), os autores verificaram que as alterações histológicas esplénicas eram responsáveis pela redução da velocidade do fluxo sanguíneo através do baço, permitindo que as células envolvidas nos processos imunológicos tivessem tempo de proliferar e de se diferenciar, facilitando também a captação de linfócitos.

Relativamente à morfologia hepática esta apresenta-se modificada pela formação de granulomas e pela hiperplasia e hipertrofia das células de Kupfer; numa fase mais avançada de infecção, o padrão observado é de uma inflamação portal linfoplasmocítica, acompanhada de áreas de necrose e fibrose compatíveis com uma hepatite crónica granulomatosa (Ferrer, 2002; Rallis *et al.*, 2005). Estas alterações traduzem-se no incremento dos valores séricos da fosfatase alcalina e da alanina aminotransferase (Slappendel, 1988).

Outro sinal frequente é crescimento contínuo das unhas (onicogrifose) acompanhado de hipersensibilidade das almofadas plantares e, por vezes, ocorrência de hiperqueratose.

A perda de peso e do apetite estão presentes em maior ou menos grau assim como a atrofia dos músculos, principalmente dos craneanos, que se traduz num envelhecimento precoce denominado “Cabeça de Velha”. Mais tarde ocorre emaciação da região dorsolombar que evolui para um estado final de caquexia. A atrofia e necrose muscular está associada à presença de formas amastigotas nas fibras musculares e à deposição de IgG (Paciello *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de uma resposta humoral não protectora caracterizada pelo aparecimento de elevados valores de anticorpos no sangue circulante provoca uma disproteinemia, com aumento das proteínas totais séricas, hiperglobulinémia e hipoalbuminemia (Slappendel, 1988). A diminuição sérica da albumina também pode estar relacionada com a nefropatia e consequente perda de proteínas ou por má nutrição (Ikeda-García *et al.*, 2007). As IgG juntamente com as fracções C1, C2 e C4 do complemento formam imunocomplexos circulantes que se depositam nos diferentes órgãos e tecidos (Alvar *et al.*, 2004; Naranjo *et al.*, 2005).

A deposição de imunocomplexos no rim leva ao aparecimento de lesões a nível tubular e glomerular (Benderitter *et al.*, 1988). No estudo realizado por Costa *et al.* (2003) os 55 cães naturalmente infectados apresentavam nefrite intersticial, glomerulonefrite (membranoproliferativa, mesângioproliferativa e glomeruloesclerótica), degeneração vacuolar, atrofia tubular e fibrose. Estas lesões alteram a função renal, afectando a evolução da doença. Os animais com nefropatia apresentam níveis séricos elevados de ureia, creatinina e colesterol e proteinúria associada à presença de eritrócitos, leucócitos e células epiteliais no sedimento urinário (Koutinas *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2003). A insuficiência renal é uma das principais causas de morte dos cães com leishmaniose (Ferrer, 1999; Alvar *et al.*, 2004; Roze, 2005).

Os imunocomplexos activam localmente o complemento e factores quimiotáticos, atraindo neutrófilos, os quais produzem enzimas hidrolíticas responsáveis por processos de vasculite e aumento da permeabilidade vascular (Agut *et al.*, 2003; Ciaramella *et al.*, 2004) alterando a capacidade de defesa do organismo, o sistema de coagulação e o fluxo sanguíneo (Font *et al.*, 1994).

A leishmaniose canina provoca no hospedeiro uma alteração persistente dos componentes do sangue e nas funções da hemostase. No início da infecção a anemia é moderada, normocítica e normocrómica e hiporegenerativa. Os animais apresentam ainda trombocitopenia e leucocitose com neutrofilia. Apesar de na fase inicial da doença se verificar na medula óssea uma forte reacção granulomatosa proliferativa, as alterações irreversíveis, que ocorrem por esgotamento (Evans & Rebêlo, 1996), conduzem a uma pancitopenia generalizada.

A epistaxis observada entre 5% a 10% dos cães é devida à acentuada trombocitopénia, ao aumento da viscosidade do soro provocada pela hiperglobulinémia, às alterações da velocidade de coagulação e à expansão das

ulcerações às fossas nasais com lesão da mucosa e perda da integridade dos tecidos nasais (Figura 1.7d) (Font *et al.*, 1994; Corona *et al.*, 2004; Petanides *et al.*, 2008).

Figura 1.7. Sinais clínicos observados na leishmaniose canina: cancrs de inoculação na orelha (a.); dermatite furfurácea (b.); ulcerações nas articulações (c.) e hiperqueratose nasal acompanhada de ulceração da mucosa (d.).



Manifestações oculares causadas pela leishmaniose em animais sintomáticos variam entre 16 e 80.5% (Naranjo *et al.*, 2005). Das várias lesões oculares observadas, a blefarite associada à dermatite facial é a mais frequente. A conjuntivite purulenta e mucopurulenta, assim como a queratoconjuntivite seca bilateral são também vulgares.

Mais raramente observam-se uveítes associadas a edema da córnea. Histologicamente estas uveítes são do tipo granulomatoso com infiltração de plasmócitos e macrófagos parasitados ou linfoproliferativas com deposição de anticorpos e frequentemente conduzem ao aparecimento de glaucomas (Evans & Rebêlo, 1996; Ciaramella *et al.*, 1997; Naranjo *et al.*, 2005; Roze, 2005).

O sistema nervoso pode ser atingido nas fases mais avançadas da doença, provocando tremores, alterações locomotoras e paralisia dos membros posteriores. Viñuelas *et al.* (2001) e McKonkey *et al.* (2002) observaram imunocomplexos e parasitas nos líquidos cefalorraquidiano e sinovial, respectivamente. A poliartrite, a osteomielite osteolítica assim como lesões de osteólise e osteoproliferativas também têm sido documentadas (Turrel & Pool; 1982; Buracco *et al.*, 1997; Viñuelas *et al.*, 2001; Agut *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006).

Um número reduzido de animais (menos de 5%) apresentam ainda ascite, diarreia crónica do intestino grosso com melenas (por ulceração da parede intestinal), sinais respiratórios (rinite, pneumonia) e alterações auto-imunes (Slappendel, 1988; Ferrer, 1999; Koutinas *et al.*, 1999).

9. Tratamento e Químio-resistência das Leishmanioses

Devido à inexistência de vacinas eficazes para as formas de leishmaniose humana (cutânea, muco-cutânea e visceral) ou canina, a terapêutica, apesar de limitada, é onerosa e tem efeitos colaterais perniciosos, continua a representar o único mecanismo de controlo quando as medidas profiláticas falham. A falta de eficácia dos fármacos existentes, a falta de ensaios clínicos de novos agentes terapêuticos e o aparecimento de resistências aportam um problema para a Saúde Pública (Gangneux, 1999; Croft, 2001; Ouellette, 2001).

À luz do conhecimento actual, o aumento do número de casos de resistência adquirida aos fármacos é um factor a ter em consideração na infecção por *L. infantum*, transmitida por agulhas (nos toxicodependentes) e nas áreas geográficas onde o reservatório canino é tratado (Croft, 2001). A quimioterapia de infecção canina, que utiliza os fármacos da medicina humana, tem uma eficácia muito reduzida, sendo frequentes as recrudescências especialmente em animais com infecções sintomáticas (Mancianti *et al.*, 1988; Alvar *et al.*, 1994). Os regimes terapêuticos (tipo de fármaco(s) e metodologia) utilizados na leishmaniose canina são muito variados, o que promove o aparecimento de químio-resistência do parasita através da forte pressão selectiva exercida pelos diversos fármacos.

Diversos factores são responsáveis pela resistência aos fármacos: (i) a diferença de sensibilidade das espécies/estirpes de *Leishmania* aos diferentes fármacos seja por adaptação fisiológica, por selecção de parasitas resistentes de uma

população mista, por mutações espontâneas ou por alterações na expressão génica; (ii) a farmacocinética (distribuição, metabolização e excreção) assim como o longo tempo de semi-vida e a sua utilização como monoterapia; (iii) o sistema imunitário do hospedeiro tendo principal relevância em indivíduos co-infectados com *Leishmania*-HIV onde se verifica a ausência de uma resposta celular específica; (iv) as diferenças moleculares e bioquímicas entre espécies; (v) a selecção por pressão farmacológica: alteração local de acção, supraexpressão (influxo, efluxo, inactivação metabólica ou sequestro da molécula alvo) e (vi) à utilização inapropriada da dose e do esquema de tratamento (Croft *et al.*, 2006; Singh, 2006).

Quando se verifica o fenómeno da resistência aos fármacos, analisa-se a frequência com que são detectadas novas estirpes resistentes a um determinado fármaco e a rapidez da expansão dessa resistência pela população infectada (Croft, 2001). A monitorização da resistência aos fármacos requer metodologias capazes de determinar: (i) a sensibilidade dos isolados do parasita e (ii) os marcadores moleculares que indicam as alterações no alvo do fármaco ou os mecanismos que alteram a concentração do mesmo no interior do parasita (Croft, 2001). O conhecimento do(s) mecanismo(s) utilizados pelos parasitas, responsáveis pela resistência, é fundamental a dois níveis: (i) poderá permitir o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania que possam substituir e/ou complementar os fármacos existentes, de uma forma eficaz e (ii) permite o desenvolvimento de metodologias para avaliação e monitorização da resistência. Infelizmente existem poucos estudos que esclareçam a base genética e bioquímica dos referidos mecanismos.

Antimoniais

Os antimoniais stibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) foram os primeiros produtos farmacológicos a serem utilizados na terapêutica das leishmanioses e ainda hoje são considerados em muitos países (América do Sul, Norte de África, Médio Oriente, Israel, e em alguns países Europeus) como de primeira linha (Gradoni *et al.*, 2008). Estes fármacos inibem as enzimas do metabolismo parasitário ao bloquear a formação de guanosina trifofasto (GTP) e adenosina trifofasto (ATP). Nos últimos 50 anos, tem sido verificado a variação da resposta clínica aos antimoniais pentavalentes. Estas variações devem-se a diferenças intrínsecas na sensibilidade das espécies de *Leishmania* (Croft, 2001) e ao uso inapropriado, como acontece na utilização de doses subterapêuticas que

permitem que o parasita desenvolva tolerância ao fármaco, ou na utilização de fármacos de fabrico de má qualidade (Sundar, 2001; Croft *et al.*, 2006). A diminuição da sensibilidade aos antimoniais pode ainda estar relacionada com uma deficiente resposta celular (Piarroux *et al.*, 1996), como se verifica na imunodepressão por HIV/SIDA.

O antimoniato de N-metilglucamina é também utilizado como fármaco de primeira linha na terapêutica da leishmaniose canina (Baneth & Shaw, 2002; Noli & Auxilia, 2005; Miró *et al.*, 2008). As principais desvantagens do fármaco na leishmaniose canina são: (i) tratamento muito dispendioso, principalmente para cães de grande porte; (ii) após vários ciclos diminui a sensibilidade do parasita ao fármaco e (iii) o tratamento dá a falsa impressão de o animal estar curado pelo que os donos o abandonam, levando ao aparecimento de recaídas clínicas e de resistências ao fármaco.

As primeiras indicações de resistência reportam-se aos anos 80 onde 30% dos doentes infectados por *L. donovani* na região de Bihar, Índia, não respondiam ao tratamento pré-estabelecido de stibogluconato de sódio. Duas décadas depois, Sundar (2001) observou que na mesma região, a percentagem de doentes resistentes ao stibogluconato de sódio situava-se entre os 30% e 80%. Em condições laboratoriais a resistência das formas promastigotas e amastigotas é facilmente induzida (Grögl *et al.*, 1989; Ephros *et al.*, 1997)

A diminuição da sensibilidade também foi observada em humanos e cães infectados por *L. infantum*. Faraut-Gambarelli *et al.* (1997) verificaram que a sensibilidade *in vitro* ao Glucantime® diminuiu em humanos imunocompetentes e imunocomprometidos após o tratamento. Gramiccia *et al.* (1992) concluíram sobre o efeito nefasto de repetidos tratamentos com Glucantime® em cães sintomáticos visto estes representarem reservatórios permanentes de parasitas resistentes aos fármacos utilizados na clínica humana. Aqueles autores verificaram que a eficácia dos antimoniais pentavalentes em estirpes de *L. infantum* inoculadas em ratinhos provenientes de cães tratados com antimoniato de meglumina é menor do que nas estirpes do parasita provenientes de cães não tratados.

Anfotericina B

Este fármaco consiste num antifúngico produzido por uma cultura de *Streptomyces nodosus*. Esta diamina aromática tem elevada afinidade pelo ergosterol da membrana celular do parasita. A variação de sensibilidade verificada nas diferentes espécies de *Leishmania* deve-se aos diferentes tipos e quantidades de esteróis existentes na membrana (Croft, 2001).

A forma lipídica da anfotericina B (AmBisome®) apresenta poucos efeitos secundários, tem como principais desvantagens o elevado custo e a via de administração parenteral, sendo inacessível na maioria dos países endémicos de leishmaniose visceral (Herwaldt, 1999; Foti, 2001; Sundar, 2001; Guerin *et al.*, 2002). Contudo, a anfotericina B substitui cada vez mais os antimoniais como fármaco de 1ª linha principalmente no Sul da Europa e Norte da Índia, no estado de Bihar, por razões distintas. No Sul da Europa o custo do fármaco não é tão relevante e os clínicos preferem prescrever um fármaco mais dispendioso (no caso da forma lipossómica) mas mais eficaz e menos tóxico e que encurta o tempo de internamento. No Norte do Bihar, devido à taxa de sucesso dos antimoniais ter decrescido para 35% (Sundar *et al.*, 2001), o Comité Nacional decidiu substituir estes fármacos pela anfotericina B onde a taxa de sucesso foi de 95% inclusivé nos doentes a que previamente foi administrado, sem sucesso, os antimoniais (Thakur *et al.*, 1996; 1999).

Num estudo efectuado em cães com leishmaniose verificou-se que apesar da remissão dos sinais clínicos os animais continuaram infectados (Oliva *et al.*, 1995).

O aparecimento de resistência não pode ser ignorado tendo em conta o seu longo tempo de semi-vida associada ao facto de que a sua acção depender do sistema imunitário do hospedeiro (Croft *et al.*, 2006). Giorgio *et al.* (1999) verificaram *in vitro* que o sucesso do tratamento com anfotericina B em indivíduos infectados por *L. infantum* depende do sistema imunitário do hospedeiro e que as sucessivas recaídas observadas permitem o aparecimento de isolados de *Leishmania* resistentes. A resistência dos parasitas a este fármaco deve-se à alteração da composição dos diversos esteróis presentes na sua membrana (Mbongo *et al.*, 1998).

Miltefosine

Recentemente, este fármaco anticancerígeno tem sido utilizado com eficácia no tratamento da leishmaniose humana visceral na Índia, inclusive nos casos refractários aos antimoniais (Escobar *et al.*, 2002; Sundar *et al.*, 2002). Devido à sua via de administração (oral) é provavelmente a melhor opção terapêutica nas regiões remotas dos países em desenvolvimento e endémicos de LV (Sundar *et al.*, 2006). Apesar deste fármaco se encontrar na IV fase de ensaios clínicos e de a sua taxa de sucesso terapêutica ser bastante elevada (94%) em crianças e adultos na Índia (Sundar *et al.*, 1998; 2002; Bhattacharya *et al.*, 2004), existem sérios inconvenientes na sua utilização nomeadamente o facto de ser um fármaco altamente teratogénico, o que limita a sua utilização em mulheres em idade fértil (Croft *et al.*, 2006). Outra das desvantagens é o longo período de semi-vida pelo que a sua utilização como monoterapia deve ser evitado de modo a prevenir o aparecimento de resistências. O desenvolvimento *in vitro* de promastigotas resistentes e a manutenção *in vivo* dessa resistência foi observada por Seifert *et al.* (2003; 2007).

Pirazolopirimidinas

A incorporação do alopurinol no lugar do ATP do ácido ribonucleico do parasita modifica a sua síntese proteica. Os promastigotas das diferentes espécies de *Leishmania* apresentam diferentes padrões de sensibilidade ao alopurinol resultante da variação do ARN parasitário.

Actualmente é muito utilizado na leishmaniose canina, não se restringindo apenas à fase de tratamento mas também na profilaxia secundária, parece ser o medicamento mais generalizado na terapêutica de manutenção. Num estudo realizado por Koutinas *et al.* (2001), 45 cães com leishmaniose foram tratados durante quatro meses com alopurinol e, apesar da remissão dos sinais clínicos e restauração dos parâmetros não ocorreu eliminação do parasita.

Apesar de nos anos oitenta ter sido utilizada em casos de LV e LC humanas, como monoterapia ou associado aos antimonias, a sua ineficácia deve-se ao facto da sua concentração no plasma humano, ao contrário do que ocorre nos cães, ser muito baixa (Shapiro *et al.*, 1991).

Paramomicina (aminosidina)

Este antibiótico aminoglicosídico, que actua sobre os ribossomas do parasita (Maarouf *et al.*, 1995), tem sido utilizado para o tratamento da LV e LC humanas (Croft, 2001) com sucesso quando combinada com os antimoniais (Thakur *et al.*, 2000). Num ensaio clínico da fase III demonstrou eficácia de 95% tanto em adultos como em crianças (Sundar *et al.*, 2007). No cão, não existem trabalhos que provem em definitivo a sua eficácia terapêutica visto que, após o tratamento mesmo com doses elevadas os animais apresentam recaídas (Vexenat *et al.*, 1998). Os principais efeitos secundários são insuficiência renal e ototoxicidade.

A resistência *in vitro* a este fármaco deve-se a uma diminuição do fluxo do fármaco para o interior dos promastigotas de *L. donovani* (Fong *et al.*, 1994; Maarouf *et al.*, 1998).

Pentamidina

Esta diamidina aromática foi o primeiro fármaco a ser utilizado nos casos refractários ao tratamento com antimoniais. No entanto este fármaco tem sido abandonado no tratamento da LV humana devido à sua elevada toxicidade e custo monetário. A sua taxa de sucesso decresceu de 95% nos anos 80 para 70% nos anos 90 (Jha *et al.*, 1998; Sundar, 2001; Zilberstein & Ephros, 2002), mas o seu uso combinado com o fármaco alopurinol durante cerca de 30 dias origina um aumento na taxa de sucesso para 91,2% nos doentes com LV e os efeitos secundários desta combinação são bastante menores que os da terapêutica única da pentamidina (Das *et al.*, 2001; Zijlstra *et al.*, 2003). O mecanismo de resistência envolve a alteração do fluxo do fármaco por parte da mitocôndria do parasita (Basselin *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2008).

Sitamaquina

Este fármaco de administração oral encontra-se na fase II dos ensaios clínicos para o tratamento da LV na Índia e no Quênia (Sangraula *et al.*, 2003; Wasunna *et al.*, 2005; Sundar & Chatterjee, 2006). Recentemente Bories *et al.* (2008) isolaram promastigotas de *L. donovani* resistentes à sitamaquina verificando que a resistência se mantinha após remoção da pressão do fármaco.

Azóis

A sensibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* aos azóis (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) dependem da composição do ergosterol da membrana. Um ensaio clínico mostrou que o cetoconazol é mais eficaz no tratamento da LC por *L. mexicana* do que por *L. braziliensis*, resultado concordante com o obtido *in vitro* por Rangel *et al.* (1996). Contudo não existe até ao momento nenhum ensaio experimental acerca dos mecanismos responsáveis pela indução de resistência (Croft *et al.*, 2006).

Marcadores moleculares putativos em *Leishmania*

Os transportadores ABC (“ATP-binding cassette”) são proteínas integrais de membrana, localizando-se na membrana plasmática ou nas membranas de organelos celulares. Medeiam o transporte entre compartimentos celulares ou para o meio extracelular, sendo a sua actividade dependente da hidrólise de ATP (Conseil *et al.*, 2005; Deeley & Cole, 1997). Alguns têm elevada relevância clínica devido à sua relação com doenças genéticas e resistência a fármacos (Pérez-Victoria *et al.*, 2001).

As proteínas ABC partilham uma arquitectura molecular semelhante, constituída pelos domínios transmembranares TMD (“transmembrane domain”) e pelos domínios de ligação ao ATP NBD (“nucleotide binding domain”) (Dean & Allikmets, 1995; Kuchler & Thorner, 1992; Higgins, 1992). As regiões transmembranares servem de âncora das proteínas à membrana e formam um canal através do qual são transportadas várias moléculas (Oswald *et al.*, 2006; Davidson & Chen, 2004).

O tipo de resistência múltipla a fármacos ou multiresistência (MDR), caracteriza-se pela resistência celular cruzada a vários compostos estruturalmente diferentes. A importância dos transportadores ABC na defesa celular contra os fármacos citotóxicos, foi observada pela primeira vez em 1973 por Dano (1973).

Vários genes da família da glicoproteína-P (*pgp*) da *Leishmania* spp, foram identificados, clonados e sequenciados e, variações no número e/ou expressão no *pgp* parecem estar implicadas no aparecimento da resistência aos fármacos (Ullman, 1995). A primeira classe de genes potencialmente ligada ao aparecimento de resistência foi o *ltpgpA* em *L. tarentolae* resistente ao metotrexato (Grondin *et al.*, 1998) e o *lmpgpA* em *L. major* (Callahan & Beverley, 1991). Outros autores verificaram a amplificação do gene *mdr* (“Multi drug resistance”), *lemdr1* em *L.*

enriettii (Chow *et al.*, 1993), do *ldmdr1* em *L. donovani* (Katakura *et al.*, 1999) e do *lamdr1* em *L. amazonensis* (Gueiros-Filho *et al.*, 1995) resistentes à vinblastina. Pérez-Victoria *et al.* (2001) verificaram um aumento na expressão do *mdr1* em culturas de promastigotas de *L. tropica* expostas durante longo tempo ao miltefosine e edelfosine.

10. Medidas de Controlo das Leishmanioses

A emergência e/ou re-emergência das doenças parasitárias, incluindo as leishmanioses, ocorrida nos últimos anos constitui um grave problema de Saúde Pública. Esta situação deve-se a uma multiplicidade de factores, de entre os quais se destacam as modificações ambientais, as condições sócio-económicas, e a resistência dos agentes patogénicos e dos vectores aos fármacos e insecticidas existentes (Tesh, 1995; Reithinger & Davies, 2002).

No controlo da leishmaniose é necessário ter presentes os dois elos da cadeia epidemiológica, o vector e o hospedeiro e de preferência programar estratégias integradas. Segunda a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), as estratégias de controlo devem incidir sobre: os vectores, relativamente às vertentes biológicas, ecológicas e químicas; o parasita, erradicando-o nos hospedeiros através do tratamento dos doentes e dos reservatórios sempre que possível; e, a protecção individual e colectiva da população humana e canina. Adicionalmente, o desenvolvimento de produtos vacinais deve ser encorajado uma vez que a vacinação é uma das medidas de controlo mais promissoras (Tesh, 1995; Dye, 1996).

No controlo do vector, o uso local/regional de insecticidas é um dos possíveis meios de eliminação dos insectos. Em regiões onde ocorra transmissão peri-urbana e os vectores sejam acessíveis, os insecticidas residuais (a utilização do DDT, durante as campanhas antimaláricas, levou a uma diminuição considerável na população dos flebótomos) podem reduzir com êxito a incidência da leishmaniose humana e canina. No entanto, devido à resistência demonstrada pelos flebótomos em algumas regiões (Kaul *et al.*, 1978; Mukhopadhyay *et al.*, 1996; Kishore *et al.*, 2006), assim como aos elevados custos e às implicações do seu uso sobre o meio ambiente e o Homem (Singh *et al.*, 2001; Tetreault *et al.*, 2001), a Organização Mundial de Saúde só recomenda a sua aplicação em casos de epidemias graves.

O controlo biológico do vector através da utilização de parasitas dos flebótomos como ácaros (Martinez-Ortega *et al.*, 1983; Shehata & Baker, 1996) e nemátodes (Killick-Kendrick *et al.*, 1989; Pires *et al.*, 1997b), assim como algumas bactérias (Yuval & Warburg, 1989; Pener & Wilamowski, 1996; Robert *et al.*, 1997) poderá também contribuir para uma diminuição da densidade vectorial. A modificação do habitat do vector através da substituição do tipo de culturas existentes e da construção de aldeias em que as fontes alimentares e potenciais abrigos estejam reduzidos, poderá contribuir para uma redução na taxa de transmissão da doença a longo prazo (WHO, 1990).

O controlo zooprofiláctico através da utilização de animais para desviar os vectores dos humanos foi testado no trabalho realizado por Chelbi *et al.* (2008). Estes autores verificaram que o número de *Phlebotomus papatasi* recolhidos no interior das habitações e na região peridoméstica foi significativamente inferior nos locais com coelheiras construídas ao redor das casas.

A protecção do Homem da picada dos flebótomos tem sido testada através do uso de redes mosquiteiras apropriadas e de cortinas impregnadas com insecticida (Elnaiem *et al.*, 1999a; 1999b; Ostyn *et al.*, 2008). Em vários estudos, verificou-se redução na abundância de várias espécies de flebótomos endofílicos, funcionando o insecticida como repelente do vector (Majori *et al.*, 1989; Mutinga *et al.*, 1992; 1993). No entanto, o sucesso desta medida está limitado a uma zona restrita, e depende do comportamento endofílico ou exofílico do vector. A aplicação individual de repelentes poderá proteger o Homem da picada dos flebótomos, contudo o tempo de actividade é reduzido e os seus efeitos variam com a espécie de *Phlebotomus* testada (Coleman *et al.*, 1993; Kalyanasundaram *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico que permitam a detecção precoce da infecção em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos, utilizando amostras de colheita não invasiva, tais como a urina ou a saliva, que sejam de simples execução e que possam ser utilizadas em regiões remotas, são outras das medidas necessárias para o controlo da doença (Guerin *et al.*, 2002). As novas metodologias deverão ainda ter valor prognóstico e detectar casos de recrudescência assim como distinguir as estirpes de *Leishmania* resistentes à terapêutica (Davies *et al.*, 2003).

Por outro lado, os esquemas de terapêutica disponíveis para esta parasitose nem sempre são eficazes, nem de fácil administração e, em determinadas regiões, a resistência aos fármacos de primeira linha são uma realidade (Lira *et al.*, 1999). No

futuro, a prevenção e o controlo da leishmaniose dependem do desenvolvimento de agentes terapêuticos não tóxicos, de administração oral, com elevada taxa de eficácia após um curto tratamento (com curas superiores a 95% em todas as áreas geográficas), contra todas as espécies do parasita, e devem poder ser administrados a indivíduos de todos os escalões etários, a grávidas e nos imunocomprometidos (Zilberstein & Ephros, 2002). A combinação de fármacos deverá prevenir ou atrasar o aparecimento de resistências além de encurtar o período de tratamento (Gangneux, 1999; Sundar, 2001; Guerin *et al.*, 2002). A restauração da imunidade nos imunocomprometidos em associação com a profilaxia secundária provavelmente tornará o tratamento mais efectivo e diminuirá o número de recidivas, principalmente nos indivíduos co-infectados com o HIV (Gangneux, 1999; Guerin *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003).

O controlo da infecção no cão, sendo este animal um reservatório do parasita, permitiria também reduzir o risco de infecção da população humana. O abate de cães domésticos sintomáticos já efectuado na China (Zhi-Biao *et al.*, 1984), no Brasil (Nascimento *et al.*, 1996; Dietze *et al.*, 1997; Ashford *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2008) e em Itália, não foi totalmente eficaz uma vez que os cães assintomáticos, constituem um bom reservatório da doença e são fonte de infecção do flebótomo (Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1994; Campino, 1998). No Brasil, ao contrário do que era esperado, verificou-se, após abate dos cães seropositivos, um aumento da incidência da leishmaniose visceral humana, (Dietze *et al.*, 1995; 1997). Seria aconselhável que se efectuasse anualmente, antes da época de transmissão, o rastreio serológico obrigatório dos cães para detecção dos cães infectados assintomáticos, de modo a serem tratados e prevenir a transmissão (Tesh, 1995; Alvar *et al.*, 1994). Dado que o abate de cães domésticos se deparar com resistências de ordem efectiva, ética e económica, o controlo da doença fica largamente dependente do êxito do tratamento. A leishmaniose no cão é mais resistente à terapia do que no homem, sendo frequentes as recrudescências após o tratamento, especialmente em animais com infecções sintomáticas (Manciati *et al.*, 1988; Alvar *et al.*, 1994). Por outro lado, quer o tratamento quer a exterminação dos reservatórios silváticos (roedores, raposas, etc.), não são exequíveis, pelo que o ciclo silvático se mantém activo (Capela, 2002).

O recolhimento dos animais antes do escurecer durante a época de transmissão (Davidson, 1999), assim como a utilização de sprays, coleiras e champôs insecticidas nos cães é uma forma de diminuir a interação vector/hospedeiro, conduzindo a uma

redução na taxa de transmissão da leishmaniose entre animais e humanos (Ascher *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 1997a; Killick-Kendick *et al.*, 1997a; Maroli *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2001; 2006; Halbig *et al.*, 2000; David *et al.*, 2001; Gavgani *et al.*, 2002; Mencke *et al.*, 2003; Miró *et al.*, 2007a). Outras medidas de controlo da leishmaniose, que englobem a redução ou extermínio dos vectores e de outros reservatórios, são difíceis de aplicar ou mesmo impraticáveis.

Uma vez que a prevenção da doença no cão é a forma mais efectiva de interrupção do ciclo de transmissão doméstico de *L. infantum*, a estratégia de controlo mais eficaz a longo prazo será o desenvolvimento de uma vacina canina anti-*Leishmania* (Tesh, 1995; Moreno & Alvar, 2002). A vacina deverá induzir uma resposta do tipo Th1, fornecer uma imunidade estéril eliminando os amastigotas que residem na pele aparentemente saudável, actuar nos dois estádios do ciclo do parasita, ser estável, barata e conferir imunidade de longa duração (Jaffe, 1999). Porém, o sucesso de uma vacina não depende única e exclusivamente do produto vacinal, mas também do protocolo de vacinação utilizado (dosagem, número de doses, intervalo de tempo entre doses), da via de administração e do tipo de adjuvante (Capela, 2002).

A experimentação no cão de produtos candidatos a vacina não é de fácil execução e é dispendiosa. Por estas razões, quase todos os produtos vacinais desenvolvidos foram testados em modelo roedor, na maior parte das vezes com sucesso. Contudo, quando aplicadas a voluntários humanos os resultados foram inconsistentes, e no cão, não conferiram imunidade, aumentando em alguns casos, a susceptibilidade dos animais à infecção por *Leishmania* (Dunan *et al.*, 1989).

Vários grupos de investigadores têm procurado induzir imunidade protectora nos canídeos (Quadro 1.3) com parasitas vivos ou mortos, (vacinas de 1ª geração), com estirpes geneticamente modificadas ou com subunidades proteicas purificadas (vacinas de 2ª geração) ou com vacinas de DNA (3ª geração). Estas vacinas consistem na inoculação de um plasmídeo que contém o(s) gene(s) alvo clonado(s) e cuja expressão *in situ* induz uma resposta antigénica específica. A estabilidade, o baixo custo, a não necessidade de adjuvantes e, a expressão persistente do(s) antígeno(s) parasitários, que permite a estimulação contínua da imunidade humoral e celular são as suas principais vantagens (Mor & Eliza, 2001; Gurunathan *et al.*, 2000; Gradoni, 2001).

Quadro 1.3. Revisão dos ensaios realizados com produtos vacinais candidatos à protecção da leishmaniose canina.

	Produto vacinal	Antígenos	Cães imunizados	Resultados	Referência
Parasitas mortos	<i>L. braziliensis</i> + BCG	<i>L. braziliensis</i> (mertiolato)	12	Fase I 100% segura	Mayrink <i>et al.</i> , 1996
			10	Fase II 90% eficaz	
	<i>L. braziliensis</i> + BCG	<i>L. braziliensis</i> (mertiolato)	1763	Fase III não eficaz	Genaro <i>et al.</i> , 1996
	ALM + BCG	<i>L. major</i> (autoclavagem)	16	Fase I e II seguro e eficaz	Mohebbi <i>et al.</i> , 1998
	ALM + BCG / saponina	<i>L. major</i> (autoclavagem)	18	Fase I Estimulação imunidade	Lasri <i>et al.</i> , 1999
	<i>L. major</i> + BCG + alumínio	<i>L. major</i> (autoclavagem)	182	Fase III 69.3% protecção	Mohebbi <i>et al.</i> , 2004a
	<i>L. braziliensis</i> + saponina + SGE	<i>L. braziliensis</i>	5	Fase I 100% eficaz	Giunchetti <i>et al.</i> , 2008a
Fracções purificadas	WPV + BCG	<i>L. braziliensis</i> + <i>L. amazonensis</i>	5	Fase I Estimulação imunidade	Giunchetti <i>et al.</i> , 2008b
	LiF2	<i>L. infantum</i> Li F2	386	Fase III sem protecção	Dunan <i>et al.</i> , 1989
	FML	<i>L. donovani</i>	58	Fase III 92% protecção	Silva <i>et al.</i> , 2000
	FML+saponina Quila	<i>L. donovani</i>	44	Fase III 95% protecção	Borja-Cabrera <i>et al.</i> , 2002
	Li ESAP-MDP	<i>L. infantum</i> Li ESAP	9	Fase II 100% protecção	Lemesre <i>et al.</i> , 2005
	Li ESAP-MDP	<i>L. infantum</i> Li ESAP	205	Fase III 92% protecção	Lemesre <i>et al.</i> , 2007
Antígenos recombinantes	proteína Q+BCG	Lip2a, Lip2b, P0, H2A	10	Fase II 90% eficaz	Molano <i>et al.</i> , 2003
	MMML + MPL-SE/AdjuPrime	TSA, LeIF, LmST11	10	Fase II não conclusivo	Fujiwara <i>et al.</i> , 2005
	MMML + MPL-SE/AdjuPrime	TSA, LeIF, LmST11	30	Fase III sem protecção	Gradoni <i>et al.</i> , 2005
	H1/HASPB1 + Montanide720	H1 e HASPB1		Fase I 100% segura	Moreno <i>et al.</i> , 2007
	H1 + HASPB1+ Montanide720		40	Fase II 50% eficaz	
Vacinas de ADN	LACK + rVV	LACK	5	Fase II 60% eficaz	Ramiro <i>et al.</i> , 2003
	pCB6-CpB e/ou pCB6-CpA + CpG-ODN + Montanide720	<i>L. infantum</i> CPB e CPA	10	Fase II 100% eficaz	Rafati <i>et al.</i> , 2005
	ADN multicomponente + IL2 + GM-CSF	<i>L. donovani</i> LACK, H1, H2A, H2B, H3, H4, PSA2, TSA, ST11, ARP1	8	Fase II 100% eficaz	Saldarriaga <i>et al.</i> , 2006
	ADN multigénica	<i>L. infantum</i> KMP-1, TSA, LACK, gp63	6	Fase I 100% segura	Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2007b
			6	Fase II sem protecção	
	MVA-LACK/rVV-LACK	LACK	8	Fase II Estimulação resposta Th1	Ramos <i>et al.</i> , 2008

L. Leishmania; BCG- Bacilo Calmette-Guerin; ALM - *L. major* autoclavada; SGE -Extracto de glândula salivar; WPV - vacina produzida com a totalidade do parasita; LiF2 - Fracção 2 de *L. infantum*; FML- Ligando da fucose manose; Quila - Saponina *Quillaia saponaria*; LiESAP - Antígenos excretados e secretados por promastigotas de *L. infantum*; MDP - Dipéptido muramyl; proteína Q - *L. infantum* proteína multicomponente química; Lip2a - Proteína 2a de *L. infantum*; Lip2b - Proteína 2b de *L. infantum*; P0 - Proteína ácida ribossómica, H2A - Histona 2a; MML - Poliproteína composta pelos antígenos TSA, Le IF e Lm ST11; MPL-SE - adjuvante; AdjuPrime - adjuvante; TSA - Antioxidante específico do tior de *L. major*; Le IF - Factor iniciador de elongação de *L. braziliensis*; LmST11 - Proteína de *L. major* indutora de stress; H1 - Histona 1; HASPB1 - Proteína de superfície B1 acetilada e hidrofílica; Montanide 720 - adjuvante; LACK - Receptor de *Leishmania* para a quinase C activada; rVV - *Virus Vaccinia* recombinante; pCB6 - vector de expressão; CPA - Proteínas de cisteína de *L. infantum* tipo I; CPB - Proteínas de cisteína de *L. infantum* tipo II; CpG-ODN - adjuvante; H2B - Histona 2b; H3- Histona 3; H4 - Histona 4; PSA2 - antígeno parasitário de superfície 2; ST11 - Proteína 1 indutora de stress de *L. major*; ARP1 - Proteína 1 relacionada com a actina; KMP-1 - Proteína 11 da membrana do cinetoplasto; gp63 - glicoproteína 63; IL12 - Interleucina 12; GM-CSF - Factor estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos; MVA -*Virus Ankara* modificado

Apesar dos resultados desencorajadores obtidos com os produtos vacinais testados, o desenvolvimento espontâneo de resistência em cães infectados (Cabral *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 1998; Pinelli *et al.*, 1994; Solano-Gallego *et al.*, 2000) incentiva a continuação de estudos sobre vacinas contra a leishmaniose canina, que indirectamente poderão contribuir para o controlo da leishmaniose zoonótica humana (Abranches *et al.*, 1998; Reithinger & Davies, 2002). Actualmente existe um vacina registada no Brasil para a prevenção da leishmaniose canina (Leishmune[®]). Este produto vacinal, além de bloquear a transmissão da infecção (Nogueira *et al.*, 2005; Saraiva *et al.*, 2006), mostrou ser eficaz quando utilizado como agente imunoterapêutico (Borja-Cabrera *et al.*, 2004). A sua principal desvantagem é o elevado custo (cerca de 120 euros por animal). Para o seu uso ser generalizado é necessário estandarizar a sua produção e efectuar mais ensaios clínicos, não só em outras regiões do Brasil como em outros países onde a infecção é endémica (Dantas-Torres, 2006).

Relativamente ao ser humano, só duas vacinas de 1^a geração se encontram licenciadas: uma vacina viva imunoproláctica, no Uzbequistão para controlo da *L. major*, e uma vacina morta imunoterapêutica para o tratamento de *L. braziliensis*, no Brasil (Palatnik-de-Sousa, 2008).

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE UMA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Leishmania infantum* NO CÃO

2. Caracterização de uma infecção por *Leishmania infantum* no cão

A leishmaniose causada por *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*), é uma zoonose endêmica na Bacia Mediterrânica afectando milhões de cães na Europa, no Norte de África, na Ásia e na América do Sul, constituindo ainda uma doença emergente na América do Norte (Rosypal *et al.*, 2003; Duprey *et al.*, 2006). O cão (*Canis familiaris*), sendo o principal hospedeiro da infecção e o principal reservatório doméstico da leishmaniose visceral humana, foi proposto como o melhor modelo animal para o estudo da resposta imunitária, para avaliação de novos compostos terapêuticos assim como de candidatos a produtos vacinais (Valladares *et al.*, 2001; Ashford *et al.*, 1998; Garg & Dube, 2006).

Espera-se de um modelo animal a reprodução dos aspectos patológicos e das respostas imunológicas observadas nos humanos quando estes são expostos à infecção por *Leishmania*. Têm-se desenvolvido vários modelos mas nenhum representa tão bem as características da infecção natural, observadas na leishmaniose visceral humana e canina, como acontece com o modelo canino (Hommel *et al.*, 1995; Cabral *et al.*, 1998; Campino, 1998; Campino *et al.*, 2000b).

A maior diferença entre as infecções natural e experimental está relacionada com o inóculo parasitário. Em condições normais, o vector introduz uma a várias centenas de promastigotas metacíclicos na derme do hospedeiro, enquanto que nas infecções experimentais o inóculo é introduzido geralmente por injeção (intradérmica ou endovenosa) e contém milhões de promastigotas provenientes de culturas *in vitro* ou amastigotas retirados de tecidos infectados (Homel *et al.*, 1995).

2.1. Material e Métodos

2.1.1. Animais

Foram utilizados neste estudo 12 exemplares (6 machos e 6 fêmeas) da espécie *Canis familiaris* raça Beagle, fornecidos por criador licenciado (Marshall Bioresources, Nova Iorque, USA) com cerca de doze semanas.

Todos os animais foram desparasitados com anti-helmínticos de largo espectro (pamoato de pirantel e ivermectina) e coccidiostáticos (amprolio e sulfadimetoxina) e vacinados contra a esgana, parvovirose, hepatite, adenovírus tipos 1 e 2, *Leptospira canicola* e *L. icterohaemorrhagiae*, parainfluenza, *Bordetella bronchiseptica*, papilomatose oral canina e raiva.

Estes animais foram mantidos no Canil do IHMT em condições climáticas e de nutrição adequadas e de acordo com as normas comunitárias (86/609/CEE) relativas ao bem-estar dos animais de experiência transpostas para a lei nacional (D.R. DL129/92 e portaria 1005/92 de 23 de Outubro, DR I série-B nº245).

O canil encontrava-se totalmente protegido com uma rede mosquiteira de malha inferior às dimensões do flebótomo e com insectocutores no seu interior de modo a evitar a transmissão natural da infecção.

Todos os procedimentos executados neste estudo foram realizados seguindo as boas práticas clínicas de “The VICH guideline (GL9) on good clinical practices for veterinary medicinal products” VICH Steering Committee, Junho de 2000.

O estudo, com duração de sete meses (o primeiro mês correspondeu ao período de quarentena decretado pela normas acima mencionadas), foi aprovado pelas comissões de ética da Direcção Geral de Veterinária e do IHMT.

2.1.2. Parasitas

Para a preparação de antígeno para as técnicas de imunofluorescência indirecta e contraimmunoelectroforese, proliferação linfocitária e infecção *in vitro* dos macrófagos foram utilizadas formas promastigotas da estirpe MHOM/PT/88/IMT151 de *Leishmania infantum* MON-1.

De forma a obter um número elevado de formas promastigotas, os parasitas foram cultivados em meio líquido de alto rendimento, incubado a +24 °C (Memmert, Alemanha): meio Schneider (Sigma, USA), suplementado com soro fetal bovino (FCS; Biochrom, Alemanha) a 20 % (v/v), previamente inactivado pelo calor (30 minutos a +56 °C) e gentamicina 50 mg/ml (Sigma).

2.1.2.1. Promastigotas

Preparação de antígeno total de *L. infantum*

O antígeno foi preparado a partir das culturas a uma concentração de 10^8 - 10^9 parasitas/ml. A contagem de parasitas foi efectuada em hemacitómetro de Neubauer (Sigma) ao microscópio óptico e os promastigotas foram recolhidos na fase estacionária de crescimento e centrifugados a 925 g (centrífuga 5810R, Eppendorf AG, Alemanha) durante 15 minutos a +4 °C. O sedimento de promastigotas foi lavado três vezes com soro fisiológico a 0.9 %, com centrifugações a 925 g durante 15 minutos a +4 °C. Após a terceira lavagem, o sobrenadante foi rejeitado e ressuspendeu-se o sedimento em 500 µl de água ultrapura. Foi de seguida iniciado o processo de lise celular através de seis ciclos sucessivos de congelação e descongelação (-20 °C, -80 °C, temperatura ambiente), no fim do qual se procedeu a centrifugação a 925 g durante 15 minutos e recolha do sobrenadante.

A concentração proteica foi determinada por espectrofotometria (Gene Quant II; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA) e o antígeno foi conservado a -20°C até à sua utilização.

2.1.2.2. Amastigotas

Para a obtenção das formas amastigotas, retiraram-se, após eutanásia, o baço e o fígado de cães infectados, os quais foram lavados em soro fisiológico penicilado (100 U/ml) e homogeneizados. O produto foi colocado em tubos de centrífuga de 50 ml (DeltaLab, Espanha) e centrifugado a 129 g, durante 5 minutos a +4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 50 ml, tendo-se rejeitado o sedimento. Lisaram-se os eritrócitos utilizando saponina (Sigma) numa proporção de 25 µg de saponina para 20 ml de sobrenadante. Após 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 1934 g, durante 10 minutos a +4°C. Após centrifugação a 1021 g durante 10 minutos a 4°C, em 20 ml de meio “Roswell Park Memorial Institute” [RPMI 1640 (Biochrom), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml], suplementado com 10 mM HEPES (ácido piperazineatanilsulfónico 4-(2-hydroxietil)-1-) (Sigma), o sedimento foi diluído em 5 ml de RPMI e as células foram desagregadas através de três passagens da suspensão através de uma seringa. Após mais duas centrifugações a 1934 g durante 10 minutos a +4°C, o sobrenadante foi rejeitado e ressuspendeu-se o sedimento em 20 ml de RPMI.

Prepararam-se duas soluções de Percol (Sigma), uma a 90% e outra a 45%. Para a solução de 90% utilizou-se 9 ml de Percol para 1 ml de solução “Hank’s balanced salt solution” (HBBS - Sigma) 10 vezes (10X) concentrada. Para a solução de 45% usou-se 5 ml da solução de Percol a 90% e 5 ml de solução de HBBS não concentrada. O sedimento obtido após as centrifugações foi ressuspendido em 6 ml da solução de Percol a 45%. Num tubo de 15 ml colocaram-se 4 ml da solução de Percol a 90% e lentamente adicionou-se, a mistura do sedimento com a solução de Percol a 45%. Centrifugou-se a 3220 g, durante 30 minutos a +15°C. Os amastigotas, devido ao gradiente de densidade, ficaram retidos num anel entre as duas soluções de Percol. Removeu-se o anel de amastigotas e procedeu-se a três lavagens a 1021 g, durante 10 minutos cada, a +4°.

O sedimento foi ressuspendido em 10 ml de soro fisiológico a 0.9%. A contagem dos amastigotas viáveis foi realizada de acordo com Cenini *et al.* (1989). Preparou-se uma solução de laranja de acridina e brometo de etídio (Sigma) ambos com uma concentração de 100 µg/ml. A 20µl da suspensão celular adicionou-se 1 µl da solução laranja de acridina/brometo de etídio. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente e protegido da luz, efectuou-se a contagem dos amastigotas em hemacitómetro de Neubauer ao microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha). Os amastigotas viáveis emitem fluorescência verde enquanto que os mortos/não viáveis emitem cor vermelha. O inóculo foi ressuspendido em soro fisiológico.

2.1.3. Inoculação

Os doze cães foram inoculados, por via endovenosa, com 10^7 amastigotas por Kg do animal com a estirpe MCAN/PT/05/IMT373 identificada por tipagem isoenzimática como *L. infantum* MON-1.

Antes da inoculação efectuou-se o exame clínico e o estudo laboratorial (hematológico, bioquímico e pesquisa de anticorpos antileishmania) dos animais.

2.1.4. Observação Clínica

2.1.4.1. Registo Diário

Diariamente procedeu-se à observação clínica de todos os animais, anotando-se eventuais sinais de doença e registou-se a temperatura e a humidade do meio ambiente. Os animais foram pesados semanalmente.

2.1.4.2. Exame Físico/Clínico

Antes da inoculação (D0) e posteriormente, mensalmente (D30, D60, D90, D120, D150 e D180), todos os animais foram submetidos a um exame clínico para pesquisa de sinais de doença compatíveis com leishmaniose canina, nomeadamente: febre, anorexia, perda de peso, presença de mucosas pálidas, de atrofia muscular, de alterações cutâneas e hipertrofia ganglionar ou outro tipo de patologia.

2.1.4.3. Exame Oftalmológico

Dois dias antes da eutanásia, foi efectuado um exame oftalmológico com a colaboração da Professora Esmeralda Delgado, médica veterinária do Departamento de Clínica, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

Procedeu-se assim à examinação de ambos globos oculares dos canídeos e os seus anexos.

No segmento anterior do olho avaliou-se a sua simetria e a integridade dos anexos, assim como os nervos óptico e facial (nervos cranianos II e VII) efectuando o reflexo de ameaça. O reflexo palpebral foi avaliado por toque na área periocular, testando-se a integridade dos nervos craniais III e VII.

De modo a avaliar a simetria das pupilas assim como a dilatação normal em resposta a intensidades luminosas baixas, utilizou-se um foco de luz brilhante numa sala escurecida, testando assim o reflexo pupilar directo e consensual.

A avaliação do filme aquoso de secreção lacrimal que cobre a superfície externa da córnea foi realizada através do Teste de Schirmer. O humedecimento das fitas é medido em milímetros por minuto. Os valores de referência são de 19 a 24 mm/minuto (Gelatt, 2000).

A pressão intraocular foi avaliada com o auxílio do tonómetro Tono-Pen XL (Medtronic Solan, USA), o qual permite medir a força necessária para aplanar a córnea numa área conhecida. A córnea anestesiada com oxibuprocaina (Anestocil®) foi tocada breve e repetidamente até que se ouviu um ruído contínuo que indica que a pressão intraocular está completa. A pressão intraocular de referência dos cães varia entre 15 a 25 mmHg (Gelatt, 2000).

A avaliação do segmento posterior, que consistiu na exame do vítreo, da retina, do disco óptico e das estruturas coroidais, foi realizado com o auxílio de um oftalmoscópio directo após dilatação da pupila com tropicermida a 10 mg/ml em veículo adequado (Trophicil Top®).

2.1.5. Recolha de Material Biológico

2.1.5.1 Sangue periférico

Antes da inoculação e posteriormente, uma vez por mês, nos dias anteriormente determinados, procedeu-se à recolha de sangue periférico a partir da veia jugular. Os animais foram colocados numa marquesa, sentados sobre os membros posteriores. A veia foi puncionada com uma agulha 21G montada em seringas de 5ml, 10 ml ou 20ml, consoante os testes a realizar.

A colheita de sangue nos D0, D90 e D180 serviu simultaneamente para a inoculação em meio de cultura (duas a três gotas), impregnação de papel de filtro (Whatman nº 3) para posterior extracção de DNA, e o restante dividido por um tubo sem anticoagulante para obtenção do soro destinado às provas seroimunológicas e bioquímicas e por um tubo com o anticoagulante EDTA (etilenediamina ácido tetra-acético; Sarsted, Alemanha) para determinação dos parâmetros hematológicos e da imunidade celular.

O soro obtido, após centrifugação a 956 g durante 10 minutos (Centrífuga Hermle ZK380, BHG, Alemanha), foi distribuído por alíquotas de 1.5 ml e conservados a +4°C quando utilizado até cinco dias após a colheita e a -80°C para determinações a efectuar posteriormente. O sangue colhido com anticoagulante, foi conservado a +4° C até à sua utilização que ocorreu sempre no mesmo dia.

Nos D0 e D180 recolheu-se 0.5 ml de sangue periférico para uma alíquota com 1 ml de “RNA/DNA stabilization reagent for blood/bone marrow” (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha). Este reagente produz lise instantânea das células e inactiva as ribonucleases, evitando a degradação do RNA. Após a mistura as amostras foram conservadas a -80°C até à extracção do RNA.

2.1.5.2. Biópsia de medula óssea

Antes da inoculação, 3 meses após (p.i.) e *post mortem*, efectuou-se biópsia aspirativa da medula óssea.

Antes do procedimento, os animais foram sedados com 0.1-0.3 ml por cada dez quilos de peso do animal de hidrocloreto de medetomidina (Domitor®, 1mg/ml, Laboratórios Pfizer, Portugal) administrados por via intramuscular (i.m.).

Após sedação os animais foram colocados em decúbito lateral esquerdo. Depois de eliminar os pêlos e desinfetar a área esternal com álcool a 70° e iodopovidona, efectuou-se a biópsia, entre a nona e décima terceira costela, 0.5 cm acima da junção costo-condral, com uma agulha 20G e seringa com 0.5 ml de soro fisiológico. A sedação foi invertida com 0.1-0.3 ml por cada dez quilos de peso do animal de hidrocloreto de atipamezol (Antisedan®, 5mg/ml, Laboratórios Pfizer, Portugal) administrados i.m.

A amostra de medula serviu simultaneamente para a inoculação em meio de cultura e impregnação de papel de filtro para posterior extracção de DNA. Nos dias D0 e D180 procedeu-se de igual modo ao descrito em 1.5.1. para posterior extracção do RNA.

2.1.5.3. Colheita de células conjuntivais

Procedeu-se à recolha de células conjuntivais com o auxílio de uma zaragatoa de algodão estéril (Gardening, Itália). Os animais foram colocados na marquesa na posição de sentado e a zaragatoa foi passada em cada uma das faces internas da pálpebra inferior. Após passagem pelas conjuntivas, as zaragatoas foram embebidas em 1 ml de PBS (VWR, Bélgica) estéril e conservadas a +4°C durante 24 horas. No dia seguinte o algodão foi pressionado contra as paredes do tubo de modo a libertar as células conjuntivais e centrifugou-se o conteúdo do tubo, tendo-se ressuspendido o “pellet” em 200 µl de PBS. As amostras foram conservadas a –80 °C até à posterior extracção de DNA.

2.1.5.4. Colheita de amostras *post mortem*

No fim da experiência os animais foram sacrificados. Após anestesia, com 0.3-0.8 ml, por cada dez quilos de peso do animal, de hidrocloreto de medetomidina, i.m., procedeu-se à eutanásia através da administração, por via intracardíaca, de 10 ml de pentobarbital sódico (Eutasil®, 200mg/ml, Ceva Saúde Animal, Portugal).

Após eutanásia efectuou-se a recolha das amostras de baço, fígado, gânglio poplíteo, pele sã (região do focinho) e lesionada (quando existente). As amostras

foram inoculadas em meio de cultura e processadas em decalques em lâmina (baço, fígado e gânglio). O restante material foi conservado a -80°C para posterior extracção de DNA (para a técnica de PCR (reacção em cadeia da polimerase) e de qRT-PCR (PCR em tempo real)) e de RNA (para medição semi-quantitativa da expressão de citocinas pela técnica de RT-PCR [transcrição reversa e amplificação do DNA complementar (cDNA) por PCR]).

Na necrópsia também foram recolhidos fragmentos de baço, fígado, pele da região do focinho, gânglio mesentérico e globo ocular com estruturas adjacentes para posterior análise histopatológica pela Prof^a M^a Conceição Peleteiro, da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

2.1.6. Determinação dos parâmetros hematológicos e proteinograma

A Leishmaniose visceral caracteriza-se também por alterações hematológicas como anemia, leucocitose, neutrofilia, linfocitose, trombocitopenia e elevada velocidade de sedimentação. As proteínas plasmáticas também sofrem alteração verificando-se o aumento das proteínas totais e da fracção gama-globulina, e diminuição acentuada da albumina (Abranches, 1984).

A determinação dos parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito, contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e constantes globulares) foi realizada em contador de glóbulos e hemoglobímetro automático (Sysmax k 1000, Toa Mediale Electronics co. LTD., UK) com a colaboração do laboratório Central do IHMT (Doutor Luís Távora Távira).

O doseamento das proteínas séricas foi efectuado em auto-analisador automático (Microtech 672PC, Interlab, Itália).

2.1.7. Estudos Parasitológicos

2.1.7.1. Exame Directo

O exame directo consistiu na pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*, através da observação microscópica de preparações dos órgãos em lâmina.

Após secagem dos decalques de baço, fígado e gânglio poplíteo, procedeu-se à fixação durante 2 minutos com metanol. Preparou-se uma solução corante de Giemsa (Merck, Alemanha) (50 µl de Giemsa por ml de água tamponada pH 7,2 - 7,4). Cobriram-se os decalques com a solução e deixou-se actuar durante 25 minutos; em

seguida procedeu-se a lavagem em água tamponada e deixou-se secar à temperatura ambiente.

2.1.7.2. Exame Cultural

É um teste largamente usado no diagnóstico da leishmaniose, tal como o exame directo. Contudo, o exame cultural é moroso, sendo por vezes necessário aguardar várias semanas (cinco semanas) até que seja possível obter o resultado.

Isolamento em meio de NNN (Novy-Nicolle-McNeal)

É um meio de cultura bifásico, de utilização comum para o isolamento de leishmanias. A fase sólida foi preparada ao calor, dissolvendo-se Bacto Agar (Difco Laboratories, USA) em água destilada, contendo 0.6% (p/v) de NaCl para uma concentração final de 1%. Distribuíram-se 4.5 ml do produto por tubo de ensaio. Após esterilização, deixou-se arrefecer até cerca de +45°C e adicionou-se assepticamente sangue de coelho desfibrinado [10 a 20 % (v/v)] (Probiológica, Portugal), agitando o tubo manualmente com movimento de rotação. Os tubos de cultura, foram colocados inclinados até solidificar o meio, conservando-se posteriormente a +4°C até à sua utilização.

Em cada tubo de meio foram inoculados 500 µl de sangue, ou medula óssea, ou aspirado ganglionar, ou biópsia de pele (sã e lesionada, quando existente) ou macerado de baço ou de fígado e adicionou-se cerca de 500-1000 µl de soro fisiológico (9gr cloreto de sódio em 1000 ml de água destilada) contendo penicilina G sódica (600 U/ml) (Labesfal, Portugal).

As culturas foram incubadas em estufa refrigerada a +24 °C, tendo sido observadas e transferidas semanalmente para novos meios de NNN. As culturas negativas foram mantidas durante cinco semanas, antes de serem rejeitadas.

2.1.8. Estudos da Imunidade Humoral

Em todas as determinações seroimunológicas foram analisados soros controlos positivo e negativo, em paralelo com as amostras de soros em estudo.

2.1.8.1. Imunofluorescência Indirecta

Preparação de antígeno figurado de *L. infantum*

O antígeno figurado foi preparado a partir de formas promastigotas de *L. infantum* em cultura como descrito em 2.1.2. Retiraram-se 50 ml da cultura e centrifugaram-se a 425 g durante 10 minutos a +4°C. O sobrenadante foi rejeitado e lavaram-se os promastigotas com soro fisiológico 0.9%. Os parasitas foram contados em hemacitômetro de Neubauer e a suspensão foi ajustada de modo a se obter uma concentração de 2×10^6 promastigotas/ml. O antígeno 10 µl/círculo foi depositado nas lâminas com 10 círculos (Bio Mérieux Portuguesa, Portugal), que se colocaram em estufa a +37°C na presença de um ventilador, para facilitar a evaporação rápida do líquido, mantendo a distribuição uniforme dos promastigotas no círculo. Após secagem o antígeno foi conservado a -80°C.

Técnica de Imunofluorescência Indirecta

A IFI foi realizada segundo o método descrito por Abranches, 1984. As lâminas com antígeno conservadas a -80°C foram colocadas à temperatura ambiente, e após secagem fixou-se o antígeno com acetona. Os soros a testar foram diluídos em progressão geométrica em PBS a pH 7.2, aplicados a cada círculo (25 µl) e incubados a + 37°C, em câmara húmida, durante 30 minutos. Após o tempo de incubação, as lâminas foram retiradas da câmara e, após rejeição do excesso de soro, colocadas em PBS a pH 7.2, durante 30 minutos. Depois de secar colocou-se 25 µl de conjugado (gama-globulinas anti-IgG de cão; Sigma) diluído em solução de azul de Evans (Sigma) (1:100000 de azul de Evans em PBS). Procedeu-se a lavagem e incubação em câmara húmida, durante meia hora, finda a qual se rejeitou o excesso de conjugado e colocou-se em PBS durante 10 minutos. Após montagem com glicerina tamponada (1:10) e lamela, procedeu-se à leitura em microscópio de fluorescência, no comprimento de onda 475.

Consideraram-se positivos os soros com fluorescência em diluições iguais ou superiores a 1/64.

2.1.8.2. Contraimuno-electroforese

Preparação de antígeno solúvel de *L. infantum*

O antígeno solúvel foi preparado a partir de formas promastigotas de *L. infantum* em cultura como descrito em 2.1.2.1.

Técnica de Contraimuno-electroforese

A CIE foi realizada segundo o método descrito por Monjour *et al.* (1978) e Campino (1998). Procedeu-se à electroforese em tampão barbital sódico 0.08 M, pH 8.2 (16 gr barbital sódico (Merck), 1000ml de água destilada, HCL 1N), utilizando tiras de acetato de celulose gelificado (Cellogel, Itália), e uma corrente de 75 V/cm, durante duas horas a +4°C (equipamento Sebia). O soro a testar (15 µl) foi depositado nas tiras no lado do ânodo e 15 µl de antígeno (50 mg/ml) no lado do cátodo, distando 1,5 cm entre ambos. Após lavagem com soro fisiológico a 0.9%, as tiras foram coradas numa solução de azul brilhante de Coomassie (Sigma) (5 gr de azul brilhante de Coomassie + 1000 ml de solução descorante, constituída por 500 ml de metanol p.a. (Merck), 400 ml da água destilada e 100 ml de ácido acético glacial p.a.) durante 10 minutos, e posteriormente, colocadas na solução descorante, até ao aparecimento dos arcos de precipitação.

Consideraram-se positivos todos os soros que, revelaram pelo menos, um arco de precipitação (Campino, 1991; 1998).

2.1.8.3. Testes Imunocromatográficos Rápidos

Teste rápido com rK39

O antígeno recombinante rK39, consiste numa proteína predominantemente expressa pela forma amastigota, a quinesina, altamente conservada no complexo *L. donovani* pelo que a sua utilização como molécula de diagnóstico apresenta uma elevada sensibilidade e tenha valor predictivo no aparecimento da fase sintomática da doença (Badaró *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2008).

O teste rK39 foi realizado segundo o método descrito pelo representante (Inbios International, USA). Após a adição, no local com as setas indicadoras, de 20 µl do soro a testar, colocou-se a tira na posição vertical, no interior de um poço de microplacas fundo em U, com as setas dirigidas para baixo. A leitura do teste fez-se nos 10 minutos subsequentes à adição de 100-150 µl do tampão do “kit”.

Teste protótipo “Lateral-flow test for the diagnosis of dog visceral leishmaniosis”

O teste foi realizado segundo o método descrito pelo representante (Bordier Affinity Products SA, Suíça). Trinta segundos após a adição de 5 µl do soro a testar, na janela da plaqueta colocaram-se duas gotas do tampão de eluição. Uma nova gota foi adicionada quatro minutos mais tarde. A leitura do teste fez-se 10 minutos após.

2.1.8.4. Técnica de ELISA

A técnica de “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) foi realizada de acordo com as instruções fornecidas (Bordier Affinity Products SA). Antes de se aplicarem os soros a testar, procedeu-se à lavagem, durante 15 minutos à temperatura ambiente, dos 96 poços de fundo plano da placa previamente sensibilizada com antígeno solúvel de *L. infantum*. O tampão de lavagem TBS-Tween foi previamente diluído 1:10. Após remoção do tampão foram adicionados 100 µl das amostras-padrão (controlo negativo, controlo com fraca positividade e controlo fortemente positivo fornecidos pelo fabricante) e das amostras a testar diluídas 1:200 em TBS-Tween. Todas as amostras foram testadas em duplicado e incubadas durante 30 minutos a +37°C. Depois de 4 lavagens, foram adicionados 100 µl/poço de proteína alcalina A, diluída a 1:50 em TBS-Tween marcada com fosfatase. Após incubação durante 30 minutos a +37°C, procedeu-se a 4 lavagens e à adição e incubação durante 30 minutos do substrato. A reacção foi então bloqueada com a adição de 100 µl de solução de bloqueio (K_3PO_4) e a absorvância lida a 405 nm em espectrofotómetro de microplacas. Considerou-se como limiar de significância a absorvância do controlo com fraca positividade.

2.1.8.5. Teste de Aglutinação Directa

Ao antígeno liofilizado (5×10^7 parasitas/ml) (KIT Biomedical Research, Holanda) adicionou-se 5 ml da solução de diluição: soro fisiológico a 0.9% contendo 0.1M β-mercapto-ethanol (Sigma).

Foram colocados 100 µl/poço da solução de diluição na primeira coluna de microplacas de 96 poços, fundo em V (DeltaLab, Espanha), e 50 µl/poço nas colunas seguintes. Após adição de 1 µl do soro a testar no primeiro poço de cada linha (diluição 1:100) realizaram-se diluições seriadas de 1:2 até à 11ª coluna. Os poços da

12ª coluna foram utilizados como controlo negativo. Em cada poço colocou-se 50 µl do antígeno reconstituído. Incubou-se à temperatura ambiente durante 18 horas. No final da incubação fez-se a leitura, a olho nú, sobre um fundo branco.

Consideraram-se positivos os soros com reacção de aglutinação na diluição igual ou superior a 1:400.

2.1.9. Estudos da Imunidade Celular

2.1.9.1. Proliferação Linfocitária

Isolamento de leucócitos mononucleados

Procedeu-se à separação das células leucocitárias mononucleadas através de um gradiente de densidade utilizando um meio de separação celular (Ficoll; GibcoBRL), o qual possui uma densidade inferior à dos eritrócitos e granulócitos e superior à das células leucocitárias mononucleadas.

Nos D0 e D180, 10 ml de sangue periférico foram diluídos a 1:2 em PBS e processados para isolamento de células mononucleadas leucocitárias por gradiente de densidade. O sangue foi colocado sobre o meio de separação de Ficoll, numa proporção de 15 ml sangue diluído para 10 ml de Ficoll, e centrifugado a 520 g durante 25 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, os eritrócitos e células polimorfonucleares ficaram retidos no sedimento, enquanto que na interface entre o Ficoll e o soro ficou um anel constituído por uma população de células mononucleadas rica em linfócitos. Este anel foi recolhido e submetido a 3 lavagens com solução de HBBS, a 290 g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, o sedimento foi ressuspendido em meio RPMI/FCS 10 % e o número e viabilidade celular foram determinados por coloração com azul de Tripán (Sigma), que confere cor azul às células não viáveis. A contagem das células viáveis realizou-se em hemacitómetro de Neubauer ao microscópio óptico, tendo sido ajustada para 2×10^6 células mononucleadas/ml.

Cultura *in vitro* de linfócitos

Foram realizadas culturas *in vitro* das células mononucleadas obtidas do sangue. As culturas celulares foram incubadas sem estimulação, com estimulação do mitogénio concanavalina A (conA, Sigma) ou com estimulação pelo antígeno (Ag) parasitário específico.

Em placas de 96 poços de fundo em U (DeltaLab, Espanha), foram colocados 150 µl das suspensões celulares por poço. Nos poços destinados às células estimuladas foram adicionados, por poço, 10 µg/ml de antígeno total de *Leishmania*, preparado como descrito em 2.1.2.1.) ou 5 µg/ml de uma solução de conA. Nos poços de células não estimuladas adicionaram-se 50 µl de meio RPMI/FCS 10 %, perfazendo assim um total de 200 µl em cada poço da placa. As células foram incubadas durante 72 horas a +37 °C, 5 % CO₂ em atmosfera húmida (Jouan/Lab Mechanics, USA). Cada amostra foi processada em triplicado para o estudo da proliferação linfocitária, para a análise da produção de citocinas por ELISA (2.1.9.2.) e expressão de citocinas pela técnica de RT-PCR (transcrição reversa da reacção em cadeia da polimerase) (2.1.9.3.).

Técnica de Proliferação Linfocitária

Neste método as células mononucleadas são colocadas em cultura na presença de agentes estimuladores seleccionados, como mitogénios e antígenios. Neste estudo, a técnica de proliferação linfocitária utilizada foi adaptada de Maluish & Strong (1986).

Ao fim das 72 horas de incubação adicionaram-se 25 µl de [³H] timidina (Amersham Life Sciences, UK) em cada poço, numa concentração final de 12.5 µCi/ml. Após 14 a 16 horas de incubação nas mesmas condições as células foram transferidas para discos de papel de filtro (Skatron, Noruega), com o auxílio de um colector de células (PHDTM Cell Harvester, Cambridge, Technology Inc., USA). Os discos foram depois recolhidos para tubos de cintilação (Packard, Holanda), aos quais foram adicionados 2.5 ml de líquido de cintilação (Packard). De seguida os tubos foram colocados ordenadamente num aparelho contador de cintilações (Beckman Ls 6500, Packard), o qual efectua a medição da radioactividade emitida pelas células em divisão. Os resultados são expressos em número de cintilações por minuto (cpm), sendo o Índice de Estimulação (IE) determinado pela razão entre o valor médio de cpm dos triplicados das células estimuladas (conA ou Ag) e o valor médio das células não estimuladas.

No presente estudo, tendo em conta os resultados do IE obtidos antes da inoculação em resposta ao antígeno (IE máximo de 1,49) considerou-se positivo um resultado de $IE \geq 2$.

2.1.9.2. Produção *in vitro* de citocinas

Foi analisada a produção das citocinas interferão gama (IFN- γ), interleucina 10 (IL-10) e factor transformador de crescimento beta (TGF- β) pelos linfócitos do sangue (na ausência e na presença de estimulação com conA e com antigénio do parasita) assim como nos macrófagos infectados *in vitro*. A análise das citocinas foi efectuada nos sobrenadantes das culturas celulares, obtidos conforme descrito em 2.2.9.1.

O método utilizado para a quantificação das citocinas libertadas pelas células em cultura foi a ELISA em “sandwich”. A combinação de dois anticorpos anti-citocina em estudo – um de captura e um de detecção - confere elevada sensibilidade e especificidade à técnica, possibilitando a detecção de quantidades reduzidas da proteína, na ordem dos picogramas (Huang, 2004).

Quantificação de citocinas por ELISA

O ensaio de ELISA em “sandwich” foi realizado em placas de 96 poços de fundo plano (Maxisorp; Nunc, USA), as quais foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (RD Systems, USA), diluído em PBS. Após incubação durante 16 horas à temperatura ambiente, procedeu-se a lavagem com tampão [(PBS/Tween 20 0.05 % (v/v) (Sigma)] e bloqueio através da adição e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente de 200 μ l/poço de tampão de bloqueio [PBS/BSA 0.05 % (p/v)].

Após nova lavagem, foram adicionados nos respectivos poços 100 μ l das amostras-padrão (as quais possuem concentrações conhecidas da citocina recombinante, diluídas a 1:2) e das amostras de concentração desconhecida. Todas as amostras foram testadas em duplicado, tendo sido incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois de 4 lavagens, foram adicionados 100 μ l/poço do anticorpo de detecção, marcado com biotina, específico para cada citocina (RD Systems). Após nova incubação de 2 horas à temperatura ambiente, procedeu-se a 4 lavagens e à adição e incubação durante 20 minutos da enzima peroxidase marcada com estreptoavidina (RD System) diluída a 1:200 em tampão [(PBS/BSA 0.05 %, Tween 20 0.05 %) (100 μ l/poço)]. Depois de 4 novas lavagens, foram adicionados 80 μ l/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB; Sigma) e incubou-se no escuro durante um período máximo de 30 minutos. A reacção foi então bloqueada com a

adição de 40 µl de ácido sulfúrico a 0.25 M e a absorvância lida a 450 nm em espectrofotómetro de microplacas (Titertek Multiskan Plus MK II).

Os valores de absorvância obtidos com os padrões da citocina recombinante foram utilizados para a construção de uma curva de calibração para cada citocina, a partir da qual se determinaram as concentrações das amostras em estudo.

No quadro 2.1 encontram-se resumidas as concentrações dos anticorpos de captura e de detecção utilizadas para cada citocina e os limites superior e inferior de concentração de citocina recombinante das amostras-padrão.

Quadro 2.1. Citocinas estudadas por ELISA "sandwich".

Citocina	Anticorpo de captura (µg/ml)	Citocina recombinante (pg /ml)	Anticorpo de detecção (ng/ml)
IFN-γ	2	4000 a 7.8	200
IL-10	2	8000 a 15.6	100
TGF-β	1	2000 a 3.9	300

2.1.9.3. Estudo da expressão de citocinas através do RNA mensageiro, por RT-PCR

O método de RT-PCR é um método semiquantitativo, que permite detectar pequenas quantidades de citocinas expressas pelas diferentes populações celulares durante a resposta imunitária a uma determinada infecção (Murphy *et al.*, 1993). O ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) extraído das células é reversamente transcrito para ácido desoxiribonucleico complementar (cDNA) e posteriormente amplificado pela técnica de PCR.

2.1.9.3.1. Extração de RNA

Para a extração de RNA das amostras de baço, fígado, pele, gânglio, medula óssea, sangue e dos leucócitos mononucleados foram utilizados dois métodos rápidos comerciais ("High Pure RNA isolation kit" para as amostras de gânglio, medula, sangue e células mononucleadas, e "High Pure RNA tissue kit" para as amostras de baço, fígado e pele, Roche Diagnostics GmbH), de acordo com as instruções do fabricante. Este método possibilita a realização de uma extração rápida de um número elevado de amostras, eliminando a necessidade da utilização de solventes orgânicos.

Todo o material utilizado para tratamento das amostras, bem como as bancadas, foram submetidos a um tratamento prévio com "RNase OUT" (Gibco).

Após a extracção, a concentração de RNA das amostras foi determinada por espectrofotometria (Gene Quant II).

As amostras foram conservadas a -80°C até posterior.

Amostras de medula óssea e de sangue total

As amostras de medula óssea (2.2.5.2) e sangue total (2.2.5.1.) conservadas a -80°C no “RNA/DNA stabilization reagent for blood/bone marrow” foram descongeladas no frio. Um ml do lisado celular foi transferido para as colunas de extracção (incluídas no teste rápido) e constituídas por um disco de fibra de vidro, onde fica selectivamente retido o RNA após centrifugação durante 30 segundos a 13000 g à temperatura ambiente. Após rejeição do sobrenadante, seguiu-se um tratamento com 100 µl desoxiribonuclease (DNase) para a remoção completa de DNA contaminante durante 15 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se uma lavagem com 500 µl de tampão de lavagem I (5 M guanidina-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6) e duas com o tampão de lavagem II (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5), a 8000 g durante 15 segundos. Após as lavagens, fez-se uma centrifugação a 13000 g (velocidade máxima) durante 2 minutos, para a remoção de possíveis vestígios de tampão de lavagem. Por fim, o RNA foi eluído das fibras de vidro por adição de 100 µl de tampão de eluição (H_2O ultrapura sem nucleases) e centrifugado a 8000 g durante 1 minuto.

Também se procedeu à extracção de RNA a partir dos leucócitos (5×10^5) obtidos como descrito em 2.1.9.1. As células foram resuspendidas em 200 µl de PBS aos quais se adicionaram 400 µl de tampão de lise. A extracção de RNA foi processada com descrito em 2.1.9.3.1

Amostras de baço, de fígado e de pele

Aos fragmentos de baço, de fígado e de pele (25 mg) colocados em aliquotas adicionou-se 400 µl de tampão de lise (4.5 M guanidina-HCl, 100 mM NaPO_4 , pH 6.6). O lisado celular foi então transferido para as colunas de extracção e procedeu-se à extracção de RNA como descrito em 2.1.9.3.1.

Amostras de gânglio

O RNA foi extraído a partir de 200 µl de aspirado ganglionar aos quais se adicionaram 400µl de tampão de lise. A extracção de RNA foi processada com descrito em 2.1.9.3.1

2.1.9.3.2. Transcrição Reversa do RNA

O RNA foi transformado por transcrição reversa em cDNA, usando 16.5 µl de RNA da amostra na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (M-MLVRT - “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”; Promega, EUA) em tampão da reacção, a 37°C durante 60 minutos. Tampão da reacção: 0.5 mM dNTPs (Promega), 10X Oligo (dT)15 (Promega), 10 mM albumina sérica bovina (BSA) (Roche Diagnostics GmbH) e 40 U RNAsin (Promega) em tampão 3 mM “MMVL-RT Buffer” 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Promega). As amostras foram aquecidas a +95°C, durante 5 minutos, para a inactivação da enzima transcriptase reversa e arrefecidas para +4°C. As reacções foram processadas num termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA).

Em cada série de reacções, uma amostra de RNA sem adição da enzima transcriptase reversa foi utilizada como controlo negativo.

2.1.9.3.3. Amplificação do cDNA por PCR

Para amplificação do cDNA utilizaram-se as sequências iniciadoras para os genes da hipoxantina-guanina fosforiboziltransferase (HPRT), IFN- γ , interleucina 4 (IL-4), IL-10, factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), TGF- β e sintetase induzida do óxido nítrico (iNOS) (Gröne *et al.*, 1998; 1999; Wang *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2004) (Quadro 2.2) e as condições de aplicação de cada gene encontram-se descritas no quadro 2.3.

Preparou-se para cada amostra de cDNA a amplificar, 25 µl de uma solução em H₂O ultrapura com 1X tampão de enzima (com 1.5µM de MgCl₂), 0.25 µM de cada dNTP e 0.4 µM de sequências iniciadoras para os genes em estudo, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 2.5 µl de cDNA.

Quadro 2.2. Sequências iniciadoras e tamanho dos produtos de amplificação para os genes de HPRT, iNOS, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4 and IL-10.

Gene	Tamanho do produto (pb)	"Forward" a)	"Reverse" b)
HPRT	329	5'- TCAAGGGAGGCTATAAATTC -3'	5'- GTCAGGTTTATAGCCAAC -3'
iNOS	661	5'- AGAAACAACAGGAACCTACCA -3'	5'- CTCCAGGATGTTGTAGCGC -3'
IFN- γ	274	5'- CCAGATGTATCGGACGGTGG -3'	5'- TTATCGCCTTGCGCTGGACC -3'
TNF- α	274	5'- CCAAGTGACAAGCCAGTAGC -3'	5'- TCTTGATGGCAGAGAGTAGG -3'
TGF- β	393	5'- TTCCTGCTCCTCATGGCCAC -3'	5'- GCAGGAGCGCACGATCATGT -3'
IL-4	399	5'- ATGGGTCTCACCTCCCAACTG -3'	5'- TCAATGCCTGTAGTATTTCTTC -3'
IL-10	516	5'- TACCTGGGTTGCCAAGCCCT -3'	5'- TTCACAGAGAAGCTCAGTAAAT -3'

a) "forward": sequência a jusante da região a estudar

b) "reverse": sequência a montante da região a estudar

pb: pares de bases

Quadro 2.3. Condições de amplificação para os genes HPRT, iNOS, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4 and IL-10.

Gene	Desnaturação inicial	Desnaturação	Ligação	Alongação	Número de ciclos	Alongação final
HPRT	95°C, 3 min	94°C, 45 seg	58°C, 45 seg	72°C, 105 seg	38	72°C, 8 min
iNOS	94°C, 3 min	94°C, 40 seg	61°C, 60 seg	72°C, 120 seg	35	72°C, 10 min
IFN- γ ; TNF- α ; TGF- β	94°C, 1 min	94°C, 60 seg	57°C, 135 seg	72°C, 1.30 min	40	72°C, 6 min
IL-4 ; IL-10	94°C, 1 min	94°C, 30 seg	67°C, 30 seg	72°C, 45 seg	5	
		94°C, 30 seg	65°C, 30 seg	72°C, 45 seg	5	
		94°C, 30 seg	60°C, 30 seg	72°C, 45 seg	5	
		94°C, 30 seg	55°C, 30 seg	72°C, 45 seg	5	
		94°C, 30 seg	50°C, 30 seg	72°C, 45 seg	10	
		94°C, 30 seg	45°C, 30 seg	72°C, 45 seg	10	72°C, 5 min

Como controlo positivo da execução técnica usou-se um gene que é expresso constitutivamente, a um nível constante e em todos os tecidos de um organismo, o gene da HPRT, uma das enzimas envolvidas na cadeia de síntese de nucleótidos.

Como controlo de amostras positivas, foram utilizadas células mononucleadas de sangue periférico de cães saudáveis obtidas como descrito em 2.1.9.1. e estimuladas com conA de modo a induzir a expressão das citocinas em estudo e da iNOS; 4 horas após incubação com conA, recolheram-se as células e procedeu-se à extracção de RNA, transcrição reversa em cDNA e amplificação pela PCR.

Os produtos de amplificação foram visualizados num gel de agarose a 1.5 % em 1X tampão tris-acetato-EDTA (TAE) (Sigma) corado com 0.5 μ g/ml de brometo de etídio. Foi aplicado no gel um marcador molecular de 100 pb de DNA (Bio-Rad, Portugal).

2.1.9.4. Produção de óxido nítrico

O método utilizado é adaptado de Ding *et al.* (1988) e baseia-se na quantificação de nitritos, derivados do óxido nítrico (NO), presentes no sobrenadante das culturas de macrófagos, através da reacção colorimétrica de Griess.

Paralelamente, à cultura *in vitro* de leucócitos mononucleadas descrita em 2.2.9.1. colocaram-se 300 µl de suspensão celular (5×10^6 /ml) em placas de 24 poços (TPP, Suíça). As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante seis dias de modo a que os monócitos, que representam 10% das células mononucleadas da suspensão, se diferenciasssem em macrófagos.

Dos macrófagos diferenciados, uma parte foi infectada *in vitro* com promastigotas na fase estacionária na proporção parasita:macrófago 5:1 e incubados com ou sem IFN- γ (100U, RD Systems, USA) durante 24 horas a +37°C, 5% CO₂. Os macrófagos não infectados foram incubados nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram recolhidos e conservados a -20°C até serem utilizados.

Medição de nitritos

Foram colocados 50 µl de sobrenadante por poço, numa placa de 96 poços de fundo plano (DeltaLab). Paralelamente, foram depositados na placa 50 µl de várias concentrações (padrões) de nitrito de sódio (1.56 a 100 µM). Num outro poço foi colocado apenas o meio de cultura dos macrófagos, que foi utilizado como branco. Todas as amostras foram testadas em duplicado. Às amostras, padrões e branco foram adicionados 50 µl de reagente de Griess, seguindo-se uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. A densidade óptica foi lida a 550 nm em espectrofotómetro de microELISA. A concentração de nitritos nas amostras foi determinada a partir da curva padrão construída com base nos valores de absorvância dos padrões.

2.1.10. Estudos Moleculares

2.1.10.1. Extracção de DNA

Para a extracção de DNA das amostras de baço, fígado, pele, gânglio, medula óssea, sangue, da camada de células mononucleadas, conjuntiva e das formas promastigotas do parasita foi utilizado um método rápido comercial (PCR Template Peparation Kit, Roche Diagnostics GmbH), de acordo com as instruções do

fabricante. Após a extracção, a concentração de DNA das amostras foi determinada por espectrofotometria (Gene Quant II).

As amostras foram conservadas a -80°C até posterior utilização nos métodos de PCR e qRT-PCR.

Amostras de baço, de fígado e pele

Os fragmentos de baço, de fígado e de pele (50 mg) foram macerados juntamente com 200 μl de tampão de lise (4 M ureia, 200 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4) e 40 μl de proteinase K (20 mg/ml). Depois de uma incubação em banho Maria a $+56^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, adicionou-se, por amostra, 200 μl de tampão de ligação [6 M guanidina-HCl, 20 % Triton X-100 (v/v), pH 4.4] e voltou-se a incubar a $+70^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. O tampão de ligação contém guanidina-HCL, um sal que promove a lise celular e a inactivação de todas as nucleases presentes na reacção; a proteinase K promove a lise celular e a inactivação de DNAses endógenas. De seguida adicionaram-se 100 μl de isopropanol (Sigma) por amostra, para precipitar o DNA. A amostra foi então transferida para as colunas de extracção, onde fica selectivamente retido o DNA após centrifugação durante 1 minuto a 8000 g. Seguiram-se uma lavagem com 500 μl de tampão de remoção de inibidores e duas lavagens com tampão de lavagem. Após as lavagens, fez-se uma centrifugação a 13000 g durante 30 segundos, para a remoção de possíveis vestígios de tampão de lavagem. Por fim, o DNA foi eluído em 200 μl de tampão de eluição (10 mM Tris, pH 8.5), previamente aquecido a $+70^{\circ}\text{C}$.

Amostras de medula óssea e sangue periférico

A extracção de DNA das células da medula óssea e do sangue foi realizada utilizando 4 discos do papel de filtro de 4 mm de diâmetro cada, os quais foram a incubar em 200 μl de tampão de lise e com 40 μl de proteinase K durante 1 hora no banho-Maria a $+56^{\circ}\text{C}$. A extracção de DNA foi processada de acordo com o referido no ponto 2.1.10.1.

Amostras da camada de células mononucleadas, gânglio linfático e conjuntiva

A extracção de DNA das células do “buffy coat”, do aspirado de gânglio e da conjuntiva, foi executada de modo semelhante ao referido no ponto 2.1.10.1., mas sem a incubação com tampão de lise. Assim, a 200 µl da suspensão celular adicionaram-se 200 µl de tampão de ligação e 40 µl de proteinase K. Após incubação a +72 °C durante 10 minutos adicionou-se 100 µl de isopropanol, homogeneizou-se e transferiu-se a amostra para a coluna de extracção. Centrifugou-se de seguida a 12000 g durante 1 minuto. A partir deste passo o procedimento foi igual ao referido para a extracção de DNA descrita anteriormente com a excepção do DNA ter sido eluído em apenas 100 µl de tampão.

Todas as amostras foram conservadas a –20 °C até à sua utilização.

Curvas-padrão

A técnica molecular utilizada para a determinação do número de parasitas presentes nas amostras requer a elaboração de uma curva-padrão, obtida a partir de diluições sucessivas de uma suspensão com um número conhecido de parasitas. Para este objectivo foi utilizada uma cultura de massa de promastigotas de *L. infantum*. A concentração de parasitas na cultura foi determinada pelo valor médio de 10 contagens realizadas em hemacitómetro ao microscópio óptico. As culturas foram então diluídas de 1:10, entre 1 e 1×10^6 parasitas, para o qRT-PCR. De seguida procedeu-se à extracção do DNA dos parasitas de cada uma das diluições, utilizando o método referido no ponto anterior (2.1.10.1.).

O DNA de cada diluição foi dividido em alíquotas e conservado a –20 °C até posterior utilização.

2.1.10.2. Oligonucleótidos

Todas as sequências iniciadoras e sondas específicas utilizadas neste estudo são as descritas por Rolão *et al.* (2004a). As sequências foram desenhadas a partir de uma sequência de DNA cinetoplastideal presente nos minicírculos de uma estirpe de *L. infantum* (Genebank A/N AF169140). A sequência do minicírculo apresenta cerca de 10000 cópias por parasita, facilitando assim a sua detecção por PCR.

2.1.10.3. Reacção de PCR

Na reacção de PCR foram utilizados as sequências iniciadoras MC: MC1 (5'-GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3') e MC2 (5'-CACCCATTTTCCGATTTTG-3') Cortes *et al.* (2004) a partir da sequência de DNA referida em 1.9.2. e usando o programa "Primer 3 (Whitehead)" (The Rockefeller University, USA). A utilização destas sequências iniciadoras resulta num produto de amplificação de PCR de 447 pb.

Preparou-se, para cada amostra (5 µl de DNA), 45 µl de uma mistura de reacção constituída por 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.2 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl₂, 1 µM de cada sequência iniciadora (MC1 e MC2) e 1 U de *Taq* DNA polymerase. As condições óptimas para as amplificações por PCR foram as seguintes: desnaturação de 2 minutos a +94 °C e 30 ciclos de 20 segundos a +94 °C (desnaturação), 20 segundos a +60 °C (ligação) e 30 segundos a +72 °C (elongação); no fim dos ciclos, uma elongação final de 5 minutos a +72 °C. Os produtos de amplificação, constituídos por 447 pb, foram visualizados num gel de agarose a 1.5 % em 1X tampão TAE corado com 0.5 µg/ml de brometo de etídio. Foi aplicado no gel um marcador de massa molecular de 100 pb de DNA.

Como controlo positivo da execução técnica usou-se o gene constitutivo da β-actina, uma das proteínas que constituem o citoesqueleto. Preparou-se, para cada amostra (2 µl de DNA), 18 µl de uma mistura de reacção constituída por 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.2 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl₂, 1 µM de cada sequência iniciadora ("forward": 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' e "reverse" 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3') e 1 U de *Taq* DNA polymerase. As condições óptimas para as amplificações por PCR foram as seguintes: 5 minutos a +94 °C e 40 ciclos de 30 segundos a +94 °C, 30 segundos a +64 °C e 30 segundos a +72 °C; no fim dos ciclos, uma elongação final de 7 minutos a +72 °C.

Os produtos de amplificação, constituídos por 283 pb, foram visualizados num gel de agarose a 1.5 % como descrito anteriormente.

Em todas as amplificações utilizou-se como controlo positivo 1 µL de DNA genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultrapura em substituição do DNA.

A preparação das reacções de PCR foi realizada numa área independente, de forma a obviar possíveis contaminações.

2.1.10.4. Reacção de qRT-PCR

No qRT-PCR, a utilização de compostos fluorescentes ligados a sondas de DNA que se vão ligando às cadeias duplas de DNA formadas durante a amplificação, permite a quantificação do produto de PCR durante a fase exponencial da reacção e, assim, a monitorização em tempo real da reacção de amplificação.

A aplicação de sondas TaqMan[®] nos sistemas de qRT-PCR permite a quantificação dos produtos de PCR devido à actividade nuclease da Taq DNA polimerase na extremidade 5' da sonda (Heid *et al.*, 1996). Esta particularidade permite a fragmentação da sonda hibridada e libertação do composto fluorescente (6-FAM). O uso de curvas-padrão permite a quantificação dos parasitas nas amostras.

As amostras de DNA foram analisadas usando os oligonucleótidos (Applied Biosystems) 5'-GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' ("primer forward"), 5'-GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT-3' ("primer reverse") e a sonda TaqMan[®] (5'-ACCACCTAAGGTCAACCC-3'), resultando um produto de amplificação de 90 pb.

As reacções de PCR foram processadas no sistema ABI PRISM[®] 5700 System (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). 2 µl de amostra de DNA foram adicionados a 18 µl de uma mistura de reacção constituída por 10 µl de 2x TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems), 0.5 µl da mistura de sequências iniciadoras e sonda TaqMan[®] MGB (FAM[™] dye-labeled, Applied Biosystems) e 7.5 µl de água ultrapura.

Todas as amostras foram testadas em duplicado.

2.1.10.5. Determinação da Carga Parasitária

Os valores obtidos por qRT-PCR foram "normalizados" em relação à concentração de DNA das amostras. A adopção desta metodologia teve por objectivo corrigir possíveis variações durante a pesagem das amostras ou no processo de extracção de DNA, bem como permitir a comparação de resultados de carga parasitária entre amostras de tecidos de estrutura sólida (baço, fígado, gânglio e pele), em que são utilizadas unidades de massa e de tecidos no estado líquido (medula óssea e o sangue periférico), em que são utilizadas unidades de volume.

O número de parasitas presentes nos 2 µl de DNA utilizados na PCR foram relacionados com a concentração de DNA da respectiva amostra, de modo a apresentar os valores de carga parasitária (CP) em número de parasitas por µg de DNA.

$$CP = \frac{N}{P}$$

CP = carga parasitária;

N = número de parasitas obtido pela técnica de qRT-PCR;

P = quantidade de solução de DNA utilizada na técnica (2 µl) e o volume total de DNA eluído na extracção (100-200 µl).

2.1.11. Análise Histopatológica

Na leishmaniose visceral, com progressão da infecção, verifica-se o aparecimento de alterações histopatológicas em vários órgãos, pelo que durante a necrópsia foram recolhidos fragmentos de baço, fígado, pele da região do focinho, gânglio mesentérico e globo ocular com estruturas adjacentes.

A análise histopatológica foi efectuada pela Professora M^a da Conceição Peleteiro, do Departamento de Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa.

Os fragmentos dos diferentes tecidos foram conservados em formol a 10% até ao seu processamento. Este foi executado de acordo com a rotina do laboratório de Anatomia Patológica, seguindo os procedimentos habituais com inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.

2.1.12. Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada no programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., USA). O teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar os parâmetros hematológicos ao longo da infecção e a carga parasitária entre os diferentes órgãos no fim do período de observação. Quando a hipótese nula foi rejeitada, múltiplas comparações de Friedman foram realizadas para determinar qual o tipo de macrófagos, utilizando um nível de significância de 5% (Mello, 1997). O teste não paramétrico de Cochran foi utilizado para comparar as diferentes técnicas serológicas

e os diferentes exames parasitológicos ao longo da infecção e para comparar a expressão de citocinas pelos diferentes órgãos no fim do período de observação. Quando a hipótese nula foi rejeitada, múltiplas comparações de Friedman foram realizadas para determinar qual a técnica serológica que foi estatisticamente diferente, utilizando um nível de significância de 5% (Sheskin, 2000).

O teste de “Wilcoxon” foi também realizado para comparar a proliferação linfocitária assim como a produção de citocinas pelas células mononucleadas leucocitárias do sangue, na ausência e na presença de estimulação com mitogénio e com antigénio do parasita assim como nos macrófagos infectados *in vitro* ou não infectados.

O teste de Spearman foi utilizado para determinar o coeficiente de correlação entre a carga parasitária dos diferentes tecidos.

2.2. Resultados

Os resultados desta experiência foram apresentados no workshop “Training course on GIS and environmental control” incluído no projecto Europeu “Monitoring risk factors of spreading of leishmaniasis around the Mediterranean basin” (Tunes, Setembro 2007) e no colóquio realizado pela Faculty of Science, da Charles University (Praga, Abril 2008).

2.2.1. Observação Clínica

2.2.1.1. Exame Físico/Clínico

Todos os animais se mantiveram vivos durante o período de observação.

Observou-se, durante o exame mensal, e ao longo dos seis meses após a inoculação de *Leishmania*, o aumento do volume dos gânglios poplíteos e pré-escapulares num animal, de modo constante e em sete de maneira transitória. Para além da linfadenomegalia, a única manifestação clínica observada foi alopecia transitória, localizada na região dorsal do corpo, em dois dos cães. Quatro dos cães mantiveram-se sem nenhum sinal clínico durante todo o período de observação.

A única alteração anatomo-patológica macroscópica registada na necrópsia foi o aumento do volume no baço em todos os animais.

2.2.1.2. Exame Oftalmológico

No exame oftalmológico realizado dois dias antes do fim do período de observação, seis cães apresentavam uma pressão intraocular (13 e 14 mmHg) inferior à de referência e em nove a produção lacrimal encontrava-se diminuída (10-17 mm/min) (Quadro 2.4).

Quadro 2.4. Exame oftalmológico realizado nos 12 cães no D178.

Cão	Schirmer		PIO		Análise Histopatológica
	OD	OE	OD	OE	
1	12	10	13	17	C. Linfoplasmocitária
2	25	21	16	17	C. Linfoplasmocitária (PCR conjuntiva +)
3	17	15	17	17	s.a.
4	23	21	15	17	s.a.
5	15	15	14	17	C. Folicular
6	15	15	14	16	C. Linfoplasmocitária
7	15	17	14	14	C. Folicular
8	17	17	14	15	C. Folicular
9	17	15	17	15	C. Linfoplasmocitária
10	22	20	14	24	s.a.
11	17	20	19	19	C. Folicular
12	17	20	15	18	C. Folicular

OD: Olho direito; OE: Olho esquerdo; PIO: Pressão intraocular; C. Conjuntivite

PCR: Reacção em cadeia da polimerase

s.a. Sem alterações

O exame das estruturas oculares detectou dois cães com conjuntivite e um com epífora ligeira. Um quarto animal apresentava quemose palpebral inferior bilateral assim como hiperémia conjuntival em ambos os olhos (Figura 2.1).

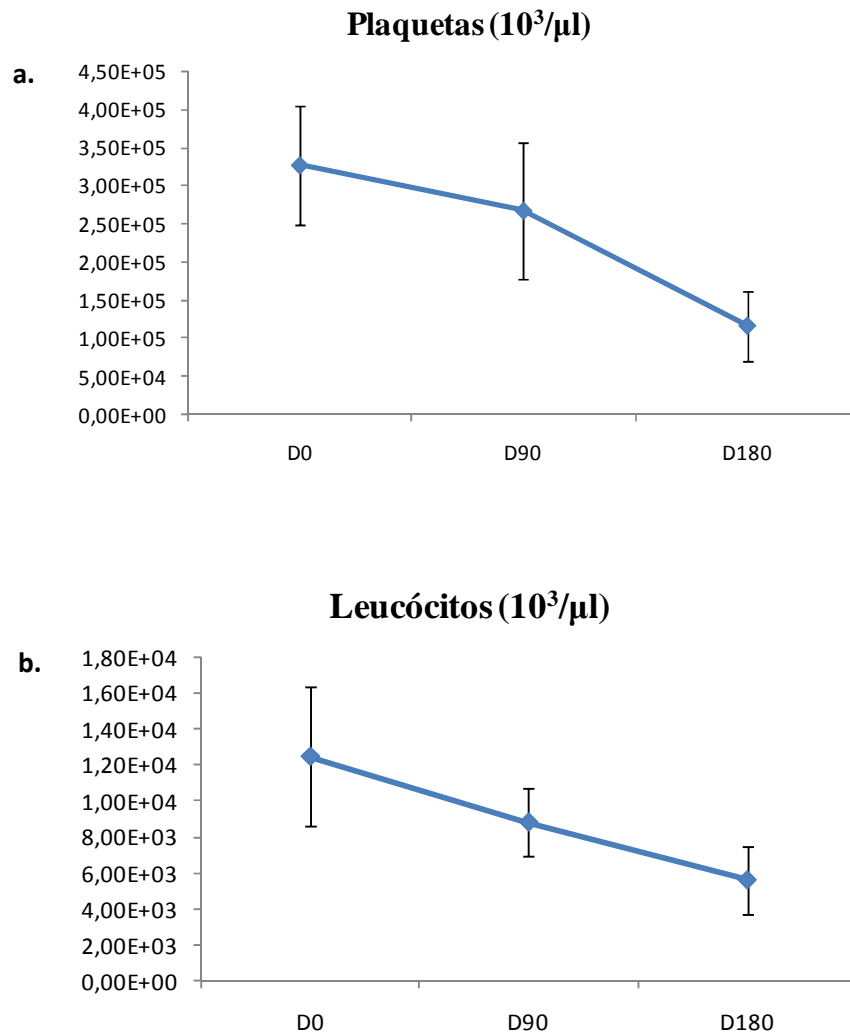
Figura 2.1. Quemose palpebral e hiperémia conjuntival inferior observada num cão no final do período de observação.

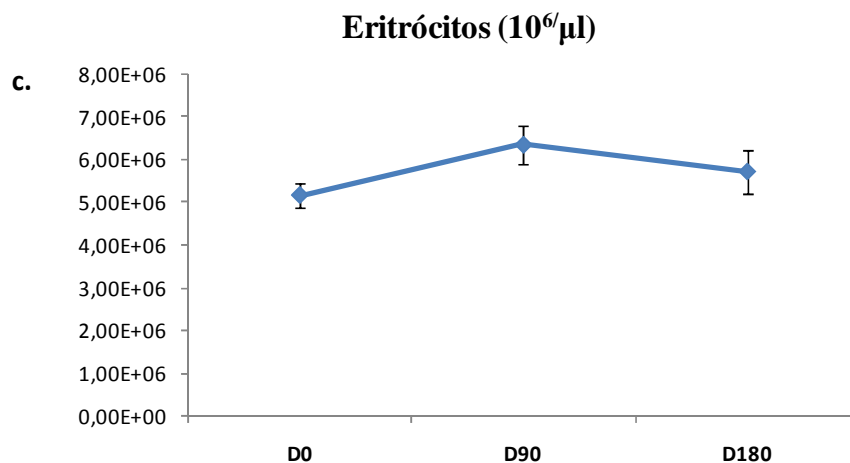


2.2.1.3. Parâmetros Hematológicos e Proteinograma

Nos dias D90 e D180 a média dos valores dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas sofreram uma diminuição significativa ($p < 0.001$) em relação aos valores de referência (D0) (Figura 2.2). Nove dos cães revelaram leucopenia e oito trombocitopenia. Cinco dos animais apresentavam anemia com diminuição do hematócrito e da concentração de hemoglobina em relação aos valores de referência ($p < 0.001$).

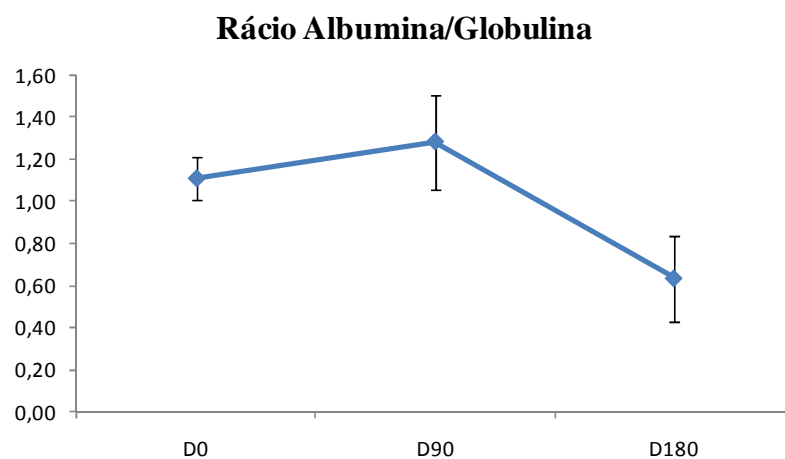
Figura 2.2. Média dos valores de plaquetas (a.), leucócitos (b.) e eritrócitos (c.) dos 12 cães ao longo do período experimental.





Apesar de três meses após infecção apenas um dos animais apresentar inversão no rácio albumina/globulina, esta alteração na concentração sérica das proteínas foi detectada em todos os cães no D180 ($p < 0.001$) (Figura 2.3). A inversão no rácio deveu-se ao aumento da fracção das γ globulinas.

Figura 2.3. Evolução do rácio albumina/globulina nos 12 animais ao longo do período experimental.



2.2.2. Estudos Parasitológicos

2.2.2.1. Exame Directo

Na necrópsia (D180) pela observação microscópica dos decalques do baço, ou fígado ou gânglio linfático, detectou-se a presença das formas amastigotas de *Leishmania* em oito cães. O parasita foi observado em cinco (41,6%) animais nas preparações de tecido esplénico, em quatro (33,3%) de tecido hepático e em três (25,0%) de aspirado ganglionar. A detecção dos amastigotas nos decalques dos três órgãos não apresentaram diferenças significativas ($p=0.903$).

Os resultados do exame directo das amostras obtidas de cada animal do D180 encontram-se descritos no quadro 2.5.

2.2.2.2. Exame Cultural

O exame cultural do sangue periférico e do aspirado de medula óssea efectuado nos D0 e D90 foi negativo.

No D180, nas culturas em meio NNN observaram-se formas promastigotas de *Leishmania* em dez dos cães (Quadro 2.5). Os parasitas foram isolados em oito (72,72%) das amostras de tecido esplénico, em cinco (41,6%) de tecido hepático, em três (25,0%) de aspirado ganglionar, em duas (16,6%) de aspirado medular e em uma (8,33%) de pele lesionada. Não se isolaram parasitas no sangue periférico nem da pele sã.

O número de culturas positivas a partir do tecido esplénico foi superior ao número de culturas de medula, de pele e do gânglio ($Q_5 = 18,099$, $p < 0.001$ em relação ao sangue, medula e pele; $p < 0.05$ em relação ao gânglio).

Nos três animais em que se isolou o parasita por cultura do aspirado ganglionar, também se identificaram as formas amastigotas por observação microscópica dos respectivos decalques. Dois dos animais apresentavam linfadenomegalia.

Durante todo o estudo apenas uma cultura foi contaminada por bactérias. A amostra, de macerado esplénico, pertencia a um cão considerado infectado pois a observação microscópica do decalque permitiu a detecção de formas amastigotas.

Num dos cães, através do exame cultural e/ou directo no D180, não foram observadas formas parasitárias nos diferentes tecidos e órgãos. As culturas de medula e sangue periférico deste animal também foram negativas nos D0 e D90.

Quadro 2.5. Resultados do exame cultural e do exame directo aplicados em diferentes tecidos e órgãos no D180.

Cão	Culturas						Decalques		
	Sangue	Fígado	Medula	Baço	Pele	Gânglio	Fígado	Baço	Gânglio
1	Neg	Neg	Neg	Cont	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
5	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
6	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
7	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
8	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos
9	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
11	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
12	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos

Neg. Amostra onde não se detectou parasitas

Pos. Amostra onde se detectou parasitas

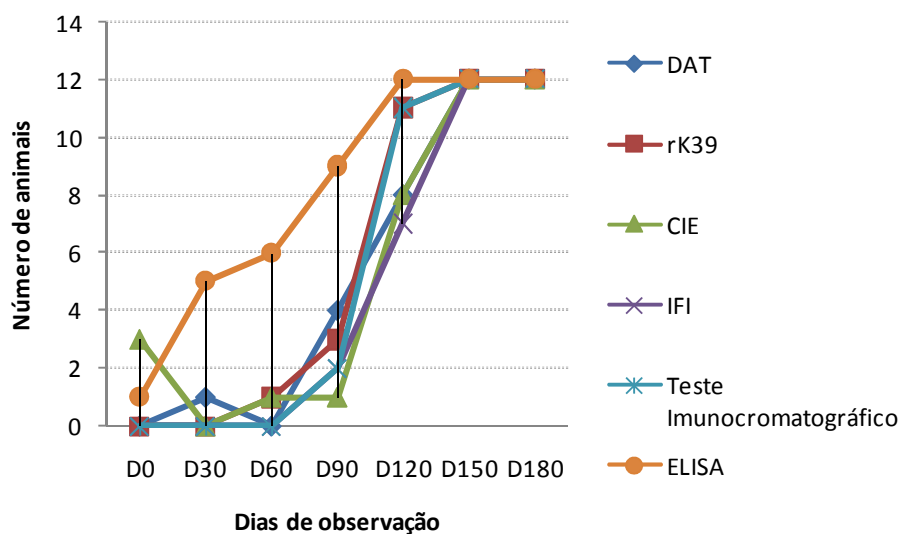
Cont. Amostra contaminada

2.2.3. Estudos de Imunidade

2.2.3.1. Imunidade Humoral

As técnicas utilizadas para a determinação de anticorpos anti-*Leishmania* foram: IFI, CIE, DAT, ELISA e testes imunocromatográficos rápidos: rK39 e “Lateral-flow test for the diagnosis of dog visceral leishmaniosis” (Figura 2.4).

Figura 2.4. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por DAT, rK39, CIE, IFI, teste imunocromatográfico protótipo e ELISA, ao longo do período experimental.



Todos os animais produziram anticorpos anti-*Leishmania* durante o período de observação após a inoculação (Quadro 2.6).

No D0, a CIE foi positiva nos soros de três animais; um deles também o foi por ELISA, não só neste dia mas ao longo de todo o período de experimentação.

No D30 os soros de cinco cães apresentaram títulos significativos na técnica de ELISA e um na DAT. O teste rK39 e a CIE detectaram animais com anticorpos específicos a partir do D60 enquanto que o teste imunocromatográfico e a IFI a partir do D90. Todos os cães apresentaram anticorpos específicos, pelo menos através de uma técnica, a partir do terceiro mês após infecção. No D120 a técnica de ELISA foi a única positiva em todos os animais apresentando diferenças significativas em relação à DAT, CIE e IFI ($p<0.05$); o rK39 e o teste imunocromatográfico também apresentaram diferenças em relação à técnica de imunofluorescência ($p<0.05$). Todas as técnicas apresentaram resultados positivos a partir do D150.

O primeiro animal a apresentar um valor elevado de anticorpos fluorescentes (1/2048) foi o cão que apresentou adenopatia poplítea persistente desde o primeiro mês após infecção. O pico de anticorpos detectado pela técnica de IFI foi no 5º mês para três dos cães (1/256 em dois animais e 1/2048 em um) enquanto que em oito animais só ocorreu no mês seguinte.

Quadro 2.6. Resultados das diferentes técnicas serológicas nos 12 animais entre os dias D0 e D180.

Cão	D0						D30						D60						D90						D120						D150						D180										
	D	R	C	I	Pt	E	D	R	C	I	Pt	E	D	R	C	I	Pt	E	D	R	C	I	Pt	E	D	R	C	I	Pt	E	D	R	C	I	Pt	E	D	R	C	I	Pt	E					
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos		
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
8	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
10	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
11	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
12	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

Neg. Amostra onde não se detectou valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania*Pos. Amostra onde se detectou valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania*

D: Teste de aglutinação directa

R: Teste rápido rK39

C: Contraímunoelctroforese

I: Imunofluorescência indirecta

Pt: Protótipo de teste imunocromatográfico

E: ELISA

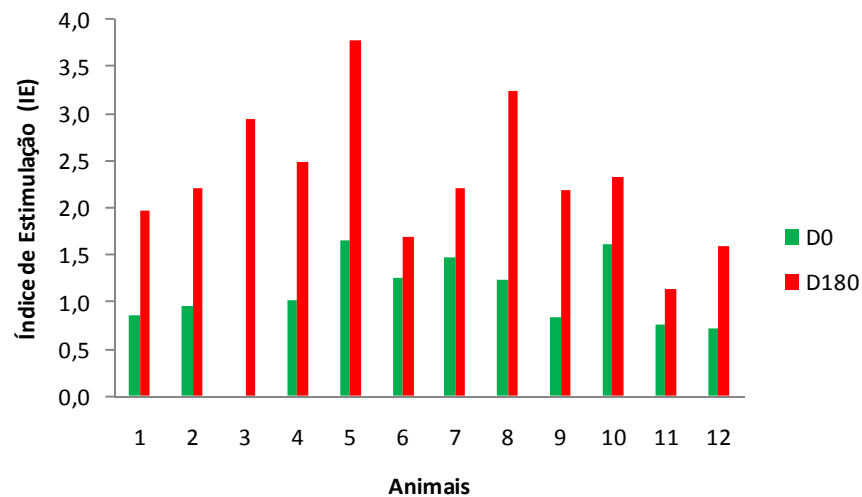
2.2.3.2. Imunidade Celular

2.2.3.2.1. Proliferação Linfocitária

A resposta celular dos cães à infecção por *Leishmania* foi avaliada através da capacidade dos linfócitos do sangue periférico proliferarem em presença do antígeno parasitário. A resposta proliferativa das células ao mitogénio (conA) foi positiva.

Verificou-se que no D180 as células de nove cães responderam à estimulação com o antígeno de *Leishmania* (IE 2-3.8) (Figura 2.5).

Figura 2.5. Resposta proliferativa ao antígeno parasitário dos linfócitos extraídos do sangue periférico dos cães, nos D0 e D180.

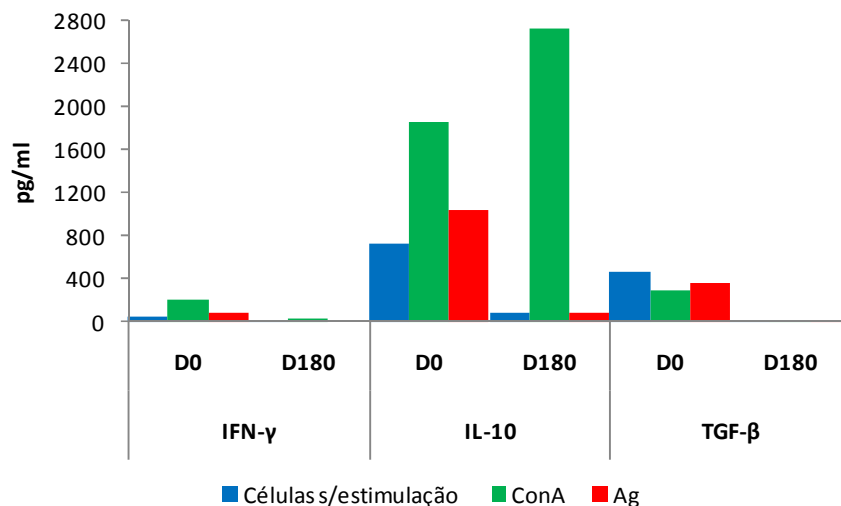


No D0 não foi possível obter células do cão nº3 para a realização desta técnica.

2.2.3.2.2. Quantificação de citocinas produzidas por linfócitos e macrófagos

No D180 a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β pelos linfócitos do sangue periférico (estimulados com mitogénio, antígeno ou sem estimulação) encontrava-se diminuída em relação aos valores de referência (D0) ($p < 0.05$) (Figura 2.6). A única exceção foram as células estimuladas com conA do D180, que produziram mais IL-10 do que no D0 ($p = 0.012$).

Figura 2.6. Produção média das citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β pelos linfócitos do sangue periférico dos 12 cães, na ausência de estímulo, após estimulação com mitogénio (conA) ou com antígeno de *Leishmania* (Ag), nos D0 e D180.



Nos macrófagos dos dias D0 e D180 infectados *in vitro* por *L. infantum*, não houve produção de IFN- γ . A IL-10 só foi detectada antes da inoculação dos cães enquanto que a TGF- β teve a sua produção máxima nos macrófagos do D180 ($p < 0.05$).

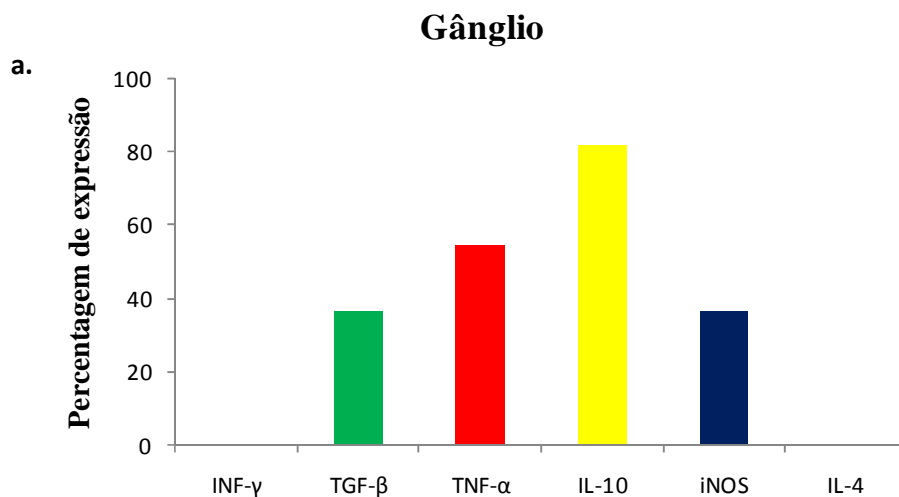
2.2.3.2.3. Expressão de citocinas nos diferentes tecidos infectados

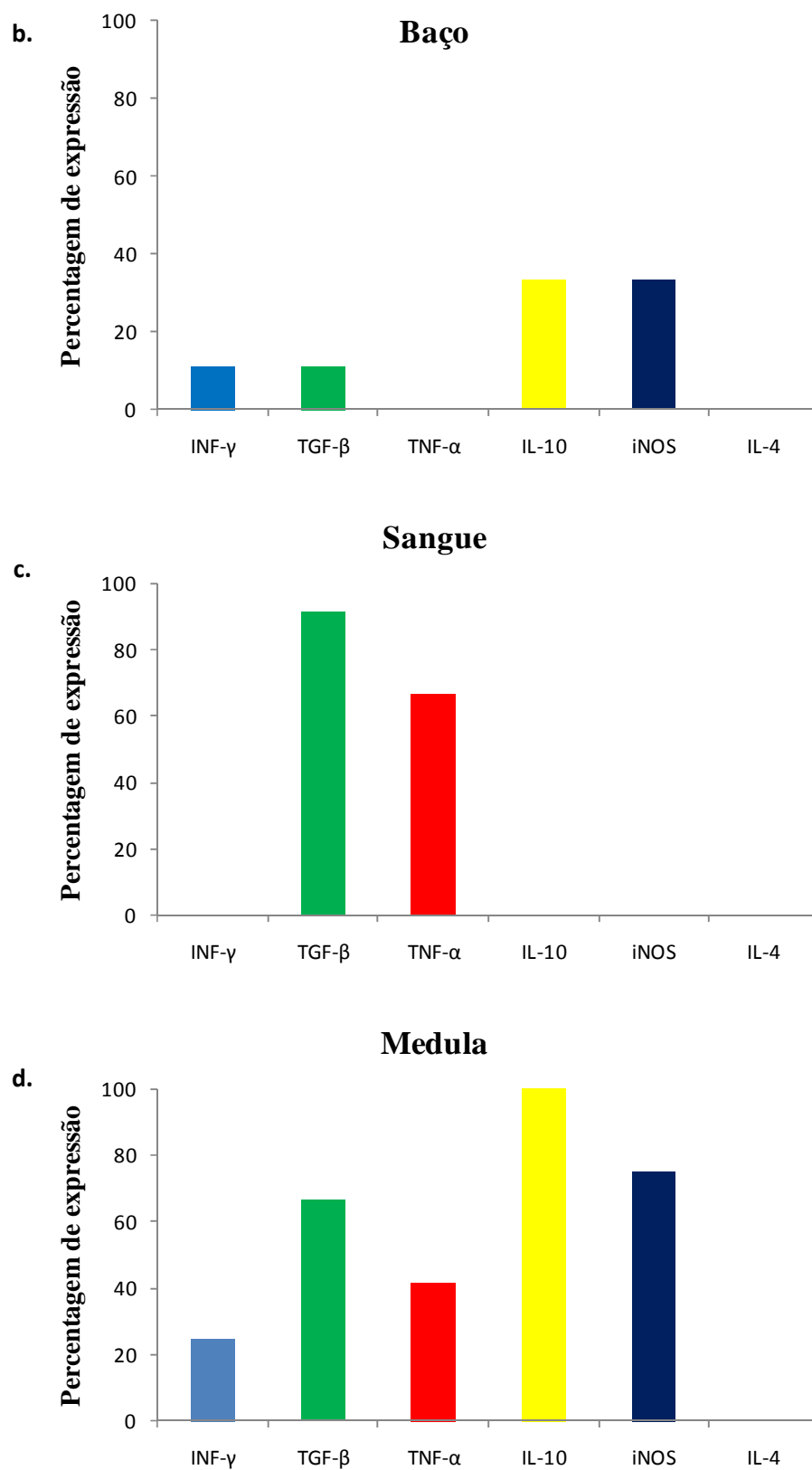
No fim do período experimental a expressão de IL-4 não foi detectada em nenhum dos tecidos enquanto IL-10 e TGF- β foram as citocinas com maior expressão, a primeira nos aspirados de medula óssea e de gânglio e a segunda na medula e sangue periférico (Figura 2.7). O TNF- α foi detectado nos aspirados de medula e de gânglio e no sangue periférico enquanto que o IFN- γ foi no fígado, baço e medula. A iNOS foi expressa em nove dos doze aspirados medulares e expressa em menor percentagem pelos esplenócitos, hepatócitos e células ganglionares. Não foi detectada expressão de citocinas em nenhuma das doze amostras de pele.

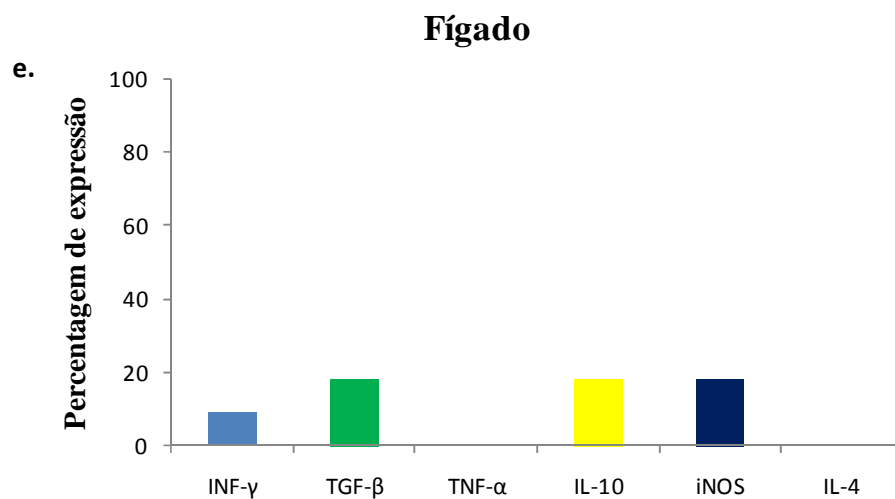
A não detecção de IL-4 em nenhum dos órgãos assim com a ausência de expressão na pele não se deveu a problemas técnicos pois a amostra utilizada como controlo de expressão de IL-4 assim como o gene constitutivo HRPT, foram positivos nas reacções de PCR.

A expressão de IL-10 e iNOS pelos esplenócitos foi estatisticamente diferente da expressão de TNF- α e IL-4 ($Q_5 = 11,664$, $p < 0.05$), enquanto que a percentagem de expressão de IL-10 pelas células do gânglio foi significativamente ($Q_5 = 28,007$), superior à de IFN- γ e IL-4 (ambas $p < 0.001$) e à de iNOS e TGF- β (ambas $p < 0.05$). A expressão de TNF- α neste órgão também foi superior à de IFN- γ e IL-4 ($p < 0.001$). A expressão de TNF- α , iNOS, TGF- β , e IL-10 pela medula foi significativamente maior que a de IL-4 ($Q_5 = 33,471$, $p < 0.001$). Com excepção da TNF- α , a expressão das restantes citocinas também foi superior à do IFN- γ ($p < 0.05$ para TGF- β e iNOS, $p < 0.01$ para IL-10). Nas células do sangue periférico, a detecção de TGF- β e TNF- α foi superior à de todas as outras ($Q_5 = 47,405$, $p < 0.001$). Não houve diferenças estatisticamente significativas na expressão de citocinas pelas células hepáticas ($Q_5 = 5,370$, $p = 0.528$).

Figura 2.7. Percentagem de expressão de IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-10 e iNOS pelo gânglio (a.), baço (b.), sangue periférico (c.), medula óssea (d.) e fígado (e.) nos doze cães, no fim do período de observação.







A expressão de cada citocina e iNOS obtidas através da técnica de RT-PCR em cada órgão/tecido de cada um dos doze animais no fim do período de observação encontram-se descritas no quadro 2. 7.

Quadro 2.7. Resultados da técnica RT-PCR relativamente à expressão das citocinas IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-10 e da iNOs nos diferentes tecidos e órgãos no D180.

Cão	Baço						Fígado						Gânglio						Sangue						Medula						
	INF- γ	TGF- β	TNF- α	IL-4	IL-10	iNOS	INF- γ	TGF- β	TNF- α	IL-4	IL-10	iNOS	INF- γ	TGF- β	TNF- α	IL-4	IL-10	iNOS	INF- γ	TGF- β	TNF- α	IL-4	IL-10	iNOS	INF- γ	TGF- β	TNF- α	IL-4	IL-10	iNOS	
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	
4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	
5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	
6	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
7	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	
8	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	
9	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	
10	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	
11	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	
12	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	

Neg: Amostra onde não se detectou expressão da citocina ou iNOS

Pos: Amostra onde se detectou expressão da citocina ou iNOS

n.e. Não efectuado por não haver expressão do gene constitutivo

2.2.3.2.4. Produção de Óxido Nítrico

Nos D0 e D180 não se detectou produção de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados do sangue periférico dos cães, não infectados e infectados com promastigotas estimulados ou não com IFN- γ .

2.2.4. Análise Molecular: PCR e qRT-PCR

Antes da inoculação não foi detectado DNA do parasita nas amostras analisadas.

Três meses após infecção, apesar da técnica de PCR e do exame cultural serem negativos nas amostras de sangue periférico e de medula óssea de todos os animais, foi amplificado DNA parasitário por qRT-PCR em 2 amostras de aspirado medular de dois animais (Quadro 2.8).

Através da técnica de PCR detectou-se no D180 DNA de *Leishmania* no baço, fígado e pele de todos os animais; em onze dos cães também a reacção de PCR foi positiva nos aspirados medulares e ganglionares assim como no “buffy coat”; a técnica só foi positiva em uma amostra de células da conjuntiva. Não se detectou DNA parasitário no sangue periférico total.

No D180 os resultados da qRT-PCR foram semelhantes aos obtidos pela técnica de PCR, isto é, esta técnica detectou parasitas em todas as amostras esplênicas, hepáticas, ganglionares, medulares e de pele. Detectou ainda a presença de DNA de *Leishmania* no sangue periférico total de três dos 12 cães. Apenas uma amostra de “buffy coat” foi negativa e apenas uma de células conjuntivais foi positiva. Não houve correlação entre as cargas parasitárias dos diferentes órgãos ($p>0.175$).

O baço foi o órgão mais parasitado (1909 a 4×10^5 leishmanias/ μg de DNA). A única cultura de pele positiva pertencia ao cão que apresentou a maior CP neste tecido (48489 leishmanias/ μg de DNA).

Os resultados das técnicas PCR e qRT-PCR foram significativamente inferiores no sangue periférico e nas células conjuntivais (PCR: $Q_{(7)} = 69,432$, $p<0.001$; qRT-PCR: $Q_{(7)} = 65,205$, $p<0.001$) do que os resultados obtidos nos outros tecidos/órgãos analisados.

Quadro 2.8. Análise do parasitismo nos diferentes tecidos e órgãos no fim do período experimental.

Cão	PCR							
	Sangue	Fígado	Medula	Baço	Pele	Gânglio	"B. coat"	Conjuntiva
1	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
2	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
3	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg
4	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
5	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
6	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
7	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
8	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
9	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
10	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg
11	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
12	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg

Cão	qRT-PCR							
	Sangue	Fígado	Medula	Baço	Pele	Gânglio	"B. coat"	Conjuntiva
1	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
2	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
3	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
4	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
5	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
6	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
7	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
8	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
9	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
10	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg
11	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
12	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg

Neg. Amostra onde não se detectou/quantificou DNA do parasita

Pos. Amostra onde se detectou/quantificou DNA do parasita

PCR: Reacção em cadeia da polimerase

qRT-PCR: Reacção em cadeia da polimerase em tempo real

"B. coat". Buffy coat

Os exames parasitológicos directo e cultural do fígado, baço e gânglio assim com as culturas de pele, de sangue e de medula, detectaram o parasita num número significativamente inferior de amostras em relação às técnicas moleculares (fígado: $Q(3) = 20,636$, $p < 0.001$; baço: $Q(3) = 14,143$, $p < 0.001$; gânglio: $Q(3) = 24,943$, $p < 0.001$; pele: $Q(2) = 22$, $p < 0.001$; medula: $Q(2) = 18,2$, $p < 0.001$).

No quadro 2.9. estão resumidos os resultados obtidos no D180 pelas diferentes técnicas aplicadas ao diagnóstico de leishmaniose canina nos doze cães do estudo.

Quadro 2.9. Resultados dos exames parasitológicos, moleculares e da proliferação linfocitária obtidos nos doze cães no D180.

Cão	Culturas						Decalques			PCR								qRT-PCR								PL -Ag
	Sangue	Fígado	Medula	Baço	Pele	Gânglio	Fígado	Baço	Gânglio	Sangue	Fígado	Medula	Baço	Pele	Gânglio	"B. coat"	Conjuntiva	Sangue	Fígado	Medula	Baço	Pele	Gânglio	"B. coat"	Conjuntiva	I.E.
1	Neg	Neg	Neg	Cont	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	2,0
2	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	2,2
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	2,9
4	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	2,5
5	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	3,8
6	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	1,7
7	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	2,2
8	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	3,3
9	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	2,2
10	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	2,3
11	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	1,1
12	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	1,6

Neg: Amostra onde não se detectou valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania* ou onde não se detectou/isolou/quantificou parasitas

Pos: Amostra onde se detectou valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania* ou onde não se detectou/isolou/quantificou parasitas

Cont: Amostra contaminada

PCR: Reacção em cadeia da polimerase

qRT-PCR: Reacção em cadeia da polimerase em tempo real

"B. coat": Buffy coat

PL-Ag: Proliferação linfocitária com estimulação das células mononucleares com antígeno de *Leishmania*

2.2.5. Análise Histopatológica

O exame histopatológico não detectou alterações significativas nos olhos dos animais em estudo. Todos os olhos apresentavam congestão discreta a moderada dos vasos coroidais, provavelmente decorrente do processo de eutanásia.

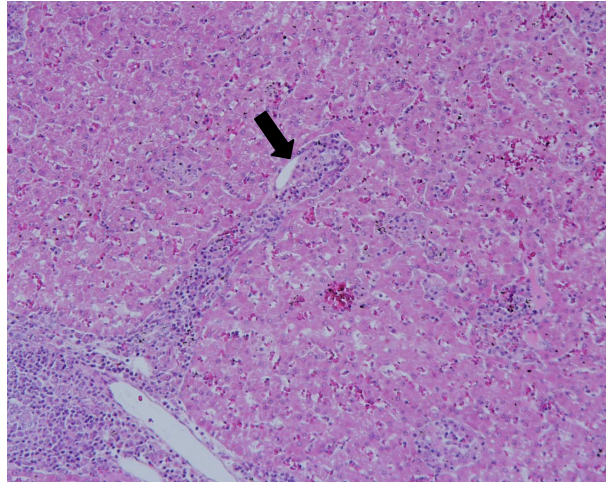
A terceira pálpebra foi a estrutura ocular anexa mais afectada. Nove dos doze cães apresentavam infiltração de células inflamatórias, linfócitos e plasmócitos, com localização subepitelial na face bulbar. Em cinco destes animais, devido à gravidade das lesões, houve formação de folículos linfóides (conjuntivite folicular).

A principal alteração observada nas pálpebras foi a infiltração perifolicular por células mononucleadas com invasão e destruição ocasional das glândulas sebáceas (adenite sebácea). A atrofia discreta das glândulas de Meibom foi observada em apenas um cão. A dispersão dos ácinos destas glândulas foi registada em dois outros animais.

Somente em três animais se detectaram alterações cutâneas com presença de infiltração perifolicular discreta por células mononucleadas afectando, ocasionalmente, as glândulas sebáceas (adenite sebácea).

A análise histopatológica do fígado permitiu concluir que os doze cães apresentavam hepatite intersticial granulomatosa difusa, caracterizada por uma acentuada infiltração periportal rica em plasmócitos (frequentes células de Mott), macrófagos e linfócitos, por vezes acompanhada de distensão moderada dos vasos linfáticos, e por um elevado número de pequenos granulomas intralobulares ricos em células macrofágicas e linfoblastos (Figura 2.8). A vacuolização moderada e generalizada dos hepatócitos foi detectada em cinco animais.

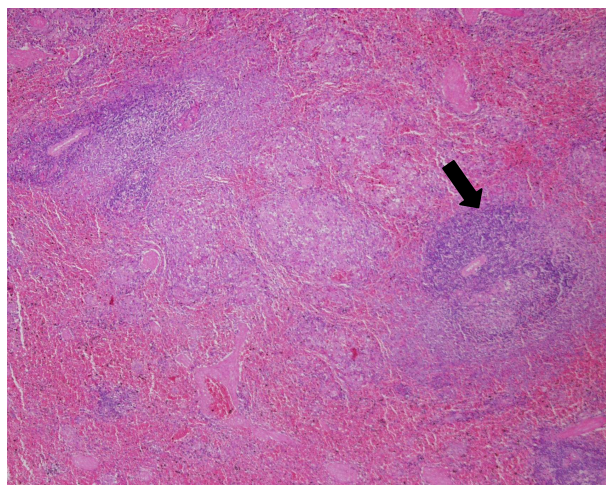
Figura 2.8. Infiltração periportal de células inflamatórias e pequenos granulomas no fígado (H&E, 40x).

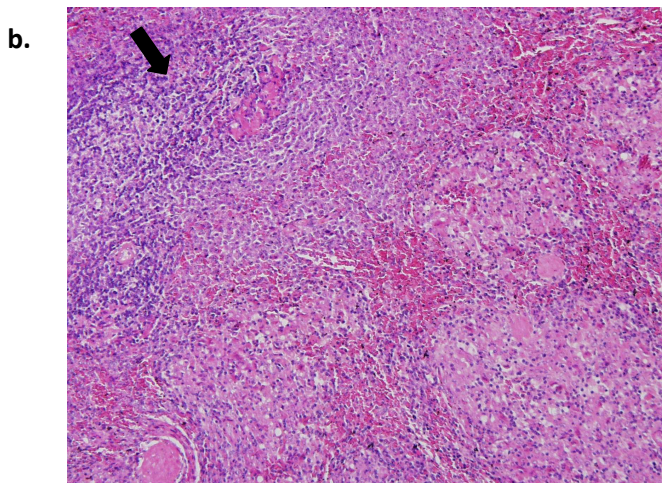


Onze dos animais apresentavam esplenite granulomatosa difusa (Figura 2.9). Os granulomas, maiores que os do fígado, preenchem significativamente a polpa vermelha. A única alteração presente no baço do animal sem granulomas, foi a hemorragia difusa da polpa vermelha. Três outros animais também apresentavam esta alteração. Na maioria dos animais observou-se ainda a presença de pigmento hemático e de megacarioblastos, indicando hematopoiese extramedular.

Figura 2.9. Granulomas dispersos pela polpa vermelha do baço (a. H&E, 40x; b. H&E, 100x).

a.





Em seis animais observou-se hiperplasia linfóide moderada da cortical e a presença de edema na zona medular no gânglio mesentérico.

Não foi detectada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* em nenhum dos órgãos analisados.

2.3. Discussão

A caracterização da evolução da infecção por *L. infantum* no principal hospedeiro e reservatório da leishmaniose na Bacia Mediterrânea é de grande relevância devido ao cão ser o principal alvo para a aplicação de compostos imunoterapêuticos e/ou imunoprolíficos, pois a interrupção do ciclo biológico do parasita contribuirá para o controle da leishmaniose visceral humana em áreas endêmicas de leishmaniose zoonótica (Hommel *et al.*, 1995; Moreno & Alvar, 2002).

Em áreas endêmicas apenas uma pequena percentagem da população canina exposta à infecção apresenta manifestações clínicas de doença (Baneth *et al.*, 2008). Num estudo realizado em Espanha, apenas 13% dos 100 cães rastreados apresentavam sintomatologia compatível com a infecção embora tenha sido possível em 63% dos animais amplificar DNA parasitário a partir de amostras de medula, de conjuntiva e/ou de pele (Solano-Gallego *et al.*, 2001b). Esta ausência de sintomatologia pode representar a fase pré-patente da infecção ou a existência de um equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (Campino, 1998). Contudo, este equilíbrio pode ser perturbado, sendo provável que, tal como acontece nos humanos, a diminuição da resistência imunitária dos cães (provocadas por deficiências

alimentares, doenças concomitantes, idade avançada, gravidez, lactação), altere a relação estabelecida entre o hospedeiro e o parasita e desencadeie a doença (Pozio *et al.*, 1981).

Apesar de todos os animais deste estudo terem ficado infectados (confirmado pela detecção de DNA parasitário nos vários tecidos e órgãos recolhidos na necrópsia), os únicos sinais clínicos observados foram linfadenomegalia e alopecia. Quatro dos cães mantiveram-se todo o tempo assintomáticos, um apresentou adenomegalia persistente e os outros sete exibiram sinais transitórios ao longo do período de observação. O aparecimento da fase sintomática em curto intervalo de tempo pode resultar do inóculo ser constituído por amastigotas, considerado mais virulento que o inóculo de formas promastigotas de cultura (Abranches *et al.*, 1991; Campino *et al.*, 2000b; Capela, 2002).

As manifestações oculares observadas em nove dos doze cães (75.0%) utilizados neste estudo encontram-se entre as prevalências de 16 e 80.5% obtidas por outros autores (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Naranjo *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2008). A alteração mais frequente foi a diminuição da secreção lacrimal, avaliada através do teste de Schirmer. No exame histopatológico, a terceira pálpebra de oito dos nove cães apresentava infiltração de células inflamatórias com localização subepitelial na face bulbar corroborando as alterações observadas por Roze (1986) e Naranjo *et al.* (2005). Estes autores verificaram que a deficiência na produção de lágrimas nos cães com leishmaniose devia-se, não à destruição dos ácinos das glândulas de Meibom, mas ao infiltrado inflamatório de células mononucleadas que ocorre nas glândulas lacrimais, por acção directa do parasita, assim como à obstrução dos ductos secretores pelo processo inflamatório das estruturas adjacentes. Curiosamente, no único animal em que a conjuntivite linfoplasmocitária da terceira pálpebra não se encontrava associada a uma diminuição da produção lacrimal, a presença do DNA parasitário foi detectado nas células conjuntivais obtidas pela passagem de uma zaragatoa nas faces internas das pálpebras inferiores.

A leishmaniose canina caracteriza-se também por alterações hematológicas como anemia, leucopenia, trombocitopenia e elevada velocidade de sedimentação. As proteínas plasmáticas também sofrem alteração verificando-se o aumento das proteínas totais e da fracção gama-globulina com diminuição acentuada do rácio albumina/globulinas (Abranches, 1984; Campino *et al.*, 2000b, Strauss-Ayali *et al.*,

2007). Estas alterações nos parâmetros hematológicos e no proteinograma foram detectadas nos animais deste estudo seis meses após a inoculação dos parasitas. O estado de pancitopenia geral pode estar relacionado com as alterações do sistema hematopoiético (aplasia da medula óssea) que ocorrem nas fases avançadas da infecção (Keenan *et al.*, 1984; Valladares *et al.*, 1998) enquanto que a elevada concentração das gama-globulinas dever-se-à, provavelmente, à estimulação policlonal das células B, a qual é responsável pela intensa resposta humoral associada à leishmaniose canina (Galvão-Castro *et al.*, 1984; Bunn-Moreno *et al.*, 1985; Alvar *et al.*, 2004).

A possibilidade de se obter uma maior quantidade de material de diferentes órgãos e assim analisar um maior número de amostras nas colheitas *post mortem* (Evans, 1989) foi provavelmente a razão da detecção do parasita ter sido mais eficaz na necrópsia do que durante o período de observação.

A observação microscópica dos decalques do baço, fígado e gânglio linfático, permitiu detectar a presença de leishmanias em oito cães. Embora a detecção tenha sido mais eficaz nas preparações de tecido esplénico e hepático não se verificaram diferenças significativas em relação aos gânglio poplíteo pelo que, ao ser o menos invasivo, este seria o tecido de eleição para a realização do exame parasitológico directo. Contudo, a distribuição das formas amastigotas nos tecidos infectados não é homogénea, pelo que este método tem alguns inconvenientes, sobretudo quando o número de parasitas na amostra é muito escasso, podendo não ser visualizados apesar de uma observação cuidada (Harith *et al.*, 1987).

O exame cultural, tal como o exame directo, é largamente usado no diagnóstico da leishmaniose e, no nosso estudo, permitiu isolar formas promastigotas de *Leishmania* em dez dos cães. Embora os métodos de cultura aumentem a sensibilidade dos exames parasitológicos, a diferença não foi significativa em relação aos decalques dos tecidos. Das 72 culturas realizadas no dia da necrópsia, apenas uma (1,4%), de macerado esplénico, foi sujeita a contaminação bacteriana. Apesar de não ter isolado parasitas nos restantes tecidos deste animal, a observação microscópica do seu decalque esplénico permitiu considerá-lo infectado, pelo que a execução dos dois métodos pode ser uma maneira de aumentar a sensibilidade do exame parasitológico. Embora no nosso estudo a percentagem de contaminações microbianas das culturas ter sido muito baixa este é um dos obstáculos a este tipo de teste de diagnóstico.

Outra das suas desvantagens é a morosidade do resultado, sendo por vezes necessário aguardar várias semanas (cinco semanas). Contudo, a cultura de tecidos provenientes de animais infectados permite obter parasitas para produção de anticorpos, para análise *in vitro* da susceptibilidade a fármacos, para infecção de modelos animais assim como para tipagem isoenzimática e até molecular do isolado.

A detecção do parasita a partir das amostras esplénicas foi significativamente superior à dos outros órgãos, com excepção do fígado. Embora a biópsia esplénica seja apontada por alguns autores como o material de eleição para o diagnóstico da LV humana (Piarroux *et al.*, 1994) e canina (Barrouin-Melo *et al.*, 2004; 2005; Rosypal *et al.*, 2005a), a maneira invasiva da colheita associada ao risco de hemorragias internas são razões válidas para não ser executada na rotina clínica.

Apesar da colheita de sangue ser a técnica menos invasiva para obtenção de material, não foi possível isolar em cultura parasitas a partir deste tecido em nenhum dos animais ao longo de todo o período de observação, provavelmente devido ao reduzido número de parasitas circulantes ou à presença no sangue canino de inibidores de crescimento parasitário (Fisa *et al.*, 2001). Tendo em conta a sensibilidade da cultura de aspirados ganglionares e medulares obtidas neste estudo assim com nos inquéritos epidemiológicos realizados por Madeira *et al.* (2006) e Maia *et al.* (2007b), constituem boas alternativas para o diagnóstico parasitológico a biópsia do gânglio poplíteo, ou no caso do animal não apresentar adenopatia, a de medula óssea.

As técnicas moleculares foram significativamente mais eficazes na detecção do parasita do que os métodos parasitológicos convencionais. A aplicação da técnica de qRT-PCR é de grande utilidade no diagnóstico da leishmaniose canina assim como na monitorização da carga parasitária durante e após tratamento de modo a avaliar a sua eficácia e prevenir recidivas associadas à permanência residual de parasitas após terapêutica (Mortarino *et al.*, 2004; Pennisi *et al.*, 2005; Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007b). Devido à sua elevada sensibilidade foi possível quantificar os parasitas existentes na medula óssea de dois cães no terceiro mês após inoculação e no sangue periférico de três dos animais no fim do período de observação, apresentando diferenças significativas em relação à técnica de PCR convencional, naquelas amostras.

A presença de componentes inibidores da amplificação de DNA no sangue total (Fisa *et al.*, 2001; Reithinger *et al.*, 2002) será provavelmente a razão pela qual foi mais eficaz a amplificação do DNA do parasita nas amostras do anel de células mononucleadas (“buffy coat”) do que no sangue total. A detecção e quantificação do DNA do parasita através das duas técnicas moleculares foi significativamente inferior nas amostras de sangue periférico e nas de células conjuntivais em relação a todas as demais amostras. Segundo Manna *et al.* (2004) a carga parasitária existente na circulação sanguínea é muito inferior à existente nos órgãos internos (medula, gânglio, fígado). É também importante realçar que a existência de parasitas circulantes não é considerada comum na infecção causada pela espécie *L. infantum* e, de acordo com alguns autores (Fichoux *et al.*, 1999), a parasitemia, para além de tardia, é intermitente sendo responsável por resultados de falsos negativos, especialmente em cães assintomáticos (Maia & Campino, 2008). Concluindo, a persistência e significado da parasitemia na leishmaniose canina ainda permanece pouco esclarecido. Contudo, a amplificação do parasita em amostras de sangue impregnadas em papel de filtro como complemento do resultado das técnicas serológicas, pode ser muito útil em estudos epidemiológicos de amostra de grande dimensão, onde não é exequível obter um elevado número de aspirados ganglionares e/ou medulares (Maia *et al.*, 2007b).

Neste estudo, as técnicas moleculares aplicadas ao DNA extraído das conjuntivas foram positivas apenas num animal (8.33%). Esta técnica não invasiva de detecção do parasita tem sido utilizada em infecções experimentais e naturais apresentando sensibilidades entre 52.2% e 92.0% e especificidade de 100% (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2008).

Apesar de três meses após inoculação apenas em dois animais se detectar DNA parasitário na medula óssea, no final do estudo, a detecção do parasita nos vários órgãos e tecidos demonstram que os canídeos não foram capazes de evitar a disseminação e a multiplicação parasitária. A maioria das infecções experimentais sugerem o baço como o órgão mais susceptível à multiplicação pelas diferentes espécies de *Leishmania* viscerotrópicas (Engwerda *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2003; Riça-Capela *et al.*, 2003; Rolão *et al.*, 2007). Dos nossos resultados pode-se concluir que o parasita apresentou um tropismo pelos órgãos internos, com o baço a ser o órgão mais parasitado seguido da medula óssea e fígado,

e que a disseminação para a pele parece acontecer em estádios mais tardios da infecção (Travi *et al.*, 2001).

Manna *et al.* (2006) avaliaram a carga parasitária de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando diferentes quadros clínicos ao longo dos dois anos de observação. Os autores encontraram uma elevada carga parasitária em biópsias de pele de animais assintomáticos. A presença de parasitas na pele de cães assintomáticos evidencia a sua importância na difusão da parasitose uma vez que, ao não apresentarem sinais de doença, não serão submetidos a qualquer medida de controlo (Campino, 1998). Apesar de assintomáticos os cães portadores são infecciosos para os flebótomos vectores (Molina *et al.*, 1994) embora constituam um risco menor que os sintomáticos (Campino, 2002).

O envolvimento visceral é caracterizado por uma resposta humoral intensa (Carvalho *et al.*, 1981). O nosso modelo experimental confirmou que, apesar de não protectora, a resposta humoral específica é pronunciada e precoce (Campino, 1998; Carrillo *et al.*, 2007).

As técnicas de ELISA e de DAT permitiram a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no primeiro mês após infecção. Apesar de ambas serem quantitativas e de poderem analisar simultaneamente um elevado número de amostras, a DAT apresenta como principal desvantagem a necessidade de se realizarem diluições seriadas dos soros a testar e, no caso da ELISA, o facto da leitura dos resultados ter que ser efectuada num espectrofotómetro. A ELISA foi significativamente a mais sensível na detecção dos animais seropositivos ao revelar logo no primeiro mês cinco soros com anticorpos específicos e este número ter ido aumentando ao longo dos meses seguintes. Também teve a particularidade de, no D60, cinco dos seis cães seropositivos corresponderem a animais que apresentavam linfadenomegalia e/ou alopecia. Esta correlação entre os animais com sintomatologia e a positividade da técnica poderá ter um valor preditivo na evolução da infecção. Contudo, é importante ressaltar que, apesar de apresentar uma sensibilidade significativamente superior às demais técnicas, a ELISA detectou anticorpos em um animal antes deste ter sido infectado. Este animal manteve-se positivo por esta técnica ao longo de todo o período de observação.

Apesar da precocidade da técnica de CIE em detectar soros com imunoglobulinas anti-*Leishmania* (Abranches *et al.*, 1991; Campino, 1998; Campino

et al., 2000b), tal como ocorreu no nosso estudo a partir do segundo mês de observação, a sua principal desvantagem foi considerar serologicamente infectados três animais antes da inoculação. A possibilidade dos animais se encontrarem infectados antes do início do estudo é ínfima tendo em conta que foram importados de um país considerado não endémico (USA) e mantidos, no IHMT, num canil com uma rede mosquiteira de malha inferior às dimensões do flebótomo e com insectocutores no seu interior. O facto de um mês após a inoculação dos parasitas todos os animais terem sido seronegativos através desta técnica, reforça o facto desta positividade transitória, também observada em infecções experimentais anteriormente realizadas no nosso laboratório (Campino, comunicação pessoal), ter sido devida a reacções cruzadas com os produtos vacinais e desparasitantes utilizados anteriormente à inoculação.

Neste estudo também se procedeu à análise de um teste rápido de imunocromatografia protótipo e de um teste comercializado como ferramentas de diagnóstico. Ambas as técnicas apresentaram uma sensibilidade de 84.61% a partir do D120. Estes testes apresentam como vantagens a fácil e rápida execução e leitura, e, no caso do rK39, um valor predictivo no aparecimento da fase aguda da doença (Badaró *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2008) pelo que a sua utilização não se deve restringir ao diagnóstico clínico mas ser alargada aos rastreios seroepidemiológicos.

A IFI, apesar de ser considerada a técnica de referência no diagnóstico serológico da leishmaniose visceral (Gradoni, 2002; Mancianti *et al.*, 2002; Alvar *et al.*, 2004), no nosso estudo foi uma das técnicas que mais demorou a detectar títulos significativos de anticorpos. Fernández-Pérez *et al.* (1999) comparou os resultados obtidos com a IFI utilizando amastigotas axénicas com os obtidos com promastigotas e verificou que, a forma existente no hospedeiro vertebrado, apresentava uma maior sensibilidade, sem perda de especificidade, na detecção de cães assintomáticos.

Cinco meses após a infecção todos os animais eram seropositivos para as seis técnicas serológicas utilizadas, o que confirma que, embora não seja relevante no controlo da infecção, a imunidade humoral é de grande valor no diagnóstico da parasitose.

A ocorrência de reacções cruzadas com outros agentes patogénicos tais como *Trypanosoma cruzi* ou *Ehrlichia canis* (Ferreira *et al.*, 2007) assim como a persistência de títulos elevados de anticorpos após resolução da infecção são algumas

das limitações das técnicas serológicas. Por outro lado é necessário que estas técnicas apresentem elevada sensibilidade e especificidade. A execução de duas técnicas com fundamentos diferentes ajudaria a evitar falsos negativos, que levariam à subestimação do grau de infecção por *Leishmania* na população canina assim como falsos positivos, que levariam à eutanásia desnecessária de animais não infectados (Maia & Campino, 2008).

Embora não sejam totalmente conhecidos os factores que estão relacionados com a presença de infecções assintomáticas ou com o desenvolvimento de doença, existem evidências de que o controlo da infecção e a sobrevivência do hospedeiro é mediada pela imunidade celular. Embora se considere que cães resistentes à infecção ou assintomáticos desenvolvam uma forte resposta celular aos antígenos do parasita, enquanto que animais susceptíveis não conseguem estabelecer uma resposta *in vitro* ao antígeno parasitário (Abranches *et al.*, 1991; Pinelli *et al.*, 1994; Quinnell *et al.*, 2001); os nossos resultados estão em conformidade com os estudos onde o desenvolvimento de uma imunidade celular específica foi observada tanto em animais assintomáticos como nos que apresentam sintomatologia, infectados de modo natural ou experimentalmente, submetidos a terapêutica ou não (Cabral *et al.*, 1993; 1998; Rhalem *et al.*, 1999; Leandro *et al.*, 2001; Fernández-Pérez *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2007). No fim do nosso estudo, apesar de todos os animais estarem infectados, os linfócitos de nove dos animais responderam ao antígeno parasitário, embora esta resposta tenha sido fraca (I.E. de 2.0 a 3.9). O cão com o maior índice de estimulação era um dos três animais que apresentavam linfadenomegalia no final do período experimental. Os outros dois animais não responderam ao antígeno.

O desenvolvimento de uma resposta imunitária protectora contra a leishmaniose é mediada pelas células T e pela produção de citocinas (Lage *et al.*, 2007). A polarização da resposta Th1 e Th2 associada com resistência ou susceptibilidade à infecção por estirpes de *Leishmania* dermatrópicas parece não se observar nas viscerotrópicas (Baneth *et al.*, 2008). Em modelo roedor e canino, a infecção por *L. infantum* induziu uma resposta mista Th1 e Th2 (Kaye *et al.*, 1991; Rolão *et al.*, 2007; Strauss-Ayali *et al.*, 2005; 2007); o controlo da infecção parece ser mediado pelas células T reguladoras ao suprimirem a resposta imunitária entre as células e/ou através da produção de citocinas supressoras tais como TGF- β ou IL-10 (Belkaid *et al.*, 2002; Gantt *et al.*, 2003; Campanelli *et al.*, 2006). A existência de um

reduzido número de estudos, realizados em diferentes fases da infecção e em diferentes órgãos de cães natural e experimentalmente infectados dificulta o conhecimento do tipo de citocinas presentes na leishmaniose canina.

Vários estudos *in vitro* (Bogdan *et al.*, 2000; Gantt *et al.*, 2001; Sisto *et al.*, 2001) e *in vivo* (Melby *et al.*, 1998; Qadoumi *et al.*, 2002; Serarslan & Atik, 2005; Zafra *et al.*, 2008) demonstraram que a expressão da iNOS pelos macrófagos é importante no controlo da leishmaniose. A produção de NO pelos macrófagos, fundamental para a fagocitose e destruição dos amastigotas (Bogdan, 2001; Gantt *et al.*, 2001) é activada através de uma resposta Th1 iniciada pelo IFN- γ e TNF- α (Pinelli *et al.*, 1994, 1995; Melby *et al.*, 1998; Bogdan *et al.*, 2000; Barbiéri, 2006). Apesar de Holzmüller *et al.* (2005) terem detectado a produção de NO após activação de macrófagos caninos infectados *in vitro* por *L. infantum* com IFN- γ produzido pelos linfócitos autólogos co-incubados com as células hospedeiras, a utilização desta citocina no presente estudo não foi um factor determinante na libertação de NO uma vez que os macrófagos caninos infectados ou não infectados, incubados com e sem IFN- γ não produziram NO. Os resultados obtidos por Pinelli *et al.* (2000) e Rodrigues *et al.* (2007) indicam que a produção de NO pelos macrófagos dos cães é menor que a produzida pelos macrófagos dos murganhos. Esta poderá ser a razão pela qual não se detectou a produção deste potente agente leishmanicida ou então à eficiente retenção da molécula no interior dos macrófagos por parte dos parasitas.

Durante a infecção por estirpes de *Leishmania* viscerotrópicas, observa-se um aumento da hematopoiese no baço e medula. O aumento compensatório do número de macrófagos presentes nestes órgãos facilita a perpetuação da infecção ao serem um alvo para o parasita. À medida que esta evolui para a cronicidade, as células imaturas mielóides geram um elevado número de células dendríticas competentes, as quais produzem elevadas quantidades de IL-10, suprimindo assim a resposta inflamatória e impedindo a eliminação dos parasitas (Stanley & Engwerda, 2007). Apesar da expressão da iNOS pelas células medulares e pelos esplenócitos ter sido significativamente elevada, o que traduz a tentativa do organismo de controlar a infecção, o aumento simultâneo da expressão de IL-10 terá sido responsável pela elevada carga parasitária observada no baço e medula em todos os animais no fim do período de observação. No entanto, é importante salientar que a expressão basal de

IL-10, observada em cães saudáveis, é importante na regulação da hematopoiese (Quinnell *et al.*, 2001).

A susceptibilidade à infecção está relacionada com a diminuição ou supressão da resposta das células T a antígenos específicos e à ausência da produção de IFN- γ pelas células mononucleadas (Pinelli *et al.*, 1994; 1995; 1999; Martínez-Moreno *et al.*, 1995; Santos-Gomes *et al.*, 2002; Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Nos macrófagos infectados *in vitro* por *L. infantum*, não houve produção de IFN- γ nos dias D0 e D180 enquanto que a produção desta citocina pelos linfócitos estava diminuída no D180 e relação ao D0. Embora os nossos resultados contrastem com os obtidos em animais oligossintomáticos e experimentalmente infectados, em que houve produção de IFN- γ após estimulação das PBMC com o antígeno parasitário (Andrade *et al.*, 1999; Strauss-Ayali *et al.*, 2005), assemelham-se aos observados em animais naturalmente infectados (Strauss-Ayali *et al.*, 2005).

Carvalho *et al.* (1992) associaram elevados níveis de produção de IFN- γ à cura da leishmaniose visceral humana. Contudo, nos últimos tempos, a persistência da infecção canina tem sido relacionada com a presença desta citocina (Corrêa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007; Strauss-Ayali *et al.*, 2007; Sanchez-Robert *et al.*, 2008). Neste estudo a expressão de IFN- γ foi apenas detectada nos órgãos internos onde a CP foi mais elevada, sugerindo que esta citocina não é sinónimo da ausência do parasita. Uma das razões para que tal aconteça pode ser a chegada constante de novos parasitas provenientes de outros tecidos (Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Apesar de Manna *et al.* (2006) sugerirem esta citocina como um marcador de progressão da infecção, a sua expressão pelas células de medula óssea e baço de cães naturalmente infectados assintomáticos e sintomáticos foi idêntica (Quinnell *et al.*, 2001).

O TNF- α , juntamente com o IFN- γ , medeiam a destruição dos parasitas nos macrófagos através da activação da iNOS e consequente produção de óxido nítrico (Liew & Millott, 1990; Farrell, 2002). Esta citocina, o TNF- α - possui diversas funções na LV, sendo algumas benéficas para a resistência do hospedeiro à infecção, enquanto que outras relacionam-se com o desenvolvimento de patologia (Kaye *et al.*, 2004; Stanley & Engwerda, 2007).

As PMBC de animais experimentalmente infectados são capazes de produzirem TNF- α em resposta ao antígeno parasitário (Pinelli *et al.*, 1994; Chamizo *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2007). Tantas as células sanguíneas dos animais do nosso

estudo como as dos cães analisados por Sanchez-Robert *et al.* (2008) expressaram TNF- α . Apesar de Carrillo *et al.* (2007) defenderem a sua utilização como marcador de avaliação da eficácia de moléculas candidatas a vacinas ao associarem a sua presença com a resolução da infecção, Lima *et al.* (2007) não observaram diferenças na sua produção entre animais saudáveis e cães com doença activa. A sua ausência em murganhos geneticamente modificados mostrou ser fatal; dois meses após a infecção experimental por *L. donovani* os animais apresentavam extensa necrose hepática (Murray *et al.*, 2000). A presença de níveis moderados de TNF- α no fígado está associado à formação de granulomas hepáticos e consequente resolução local da infecção (Malla & Mahajan, 2006; Stanley & Engwerda, 2007), no entanto, neste estudo não se detectou a sua expressão neste órgão, podendo a sua ausência estar relacionada com a não eliminação da carga parasitária. A supressão precoce da sua produção representa um mecanismo de sobrevivência dos parasitas à resposta pro-inflamatória do hospedeiro (Stanley & Engwerda, 2007). Tal como observado nas amostras hepáticas, não houve expressão desta citocina Th1 em nenhuma das amostras esplénicas analisadas. Lage *et al.* (2007) detectaram a sua presença tanto no baço de animais saudáveis assim como em cães naturalmente infectados com diferentes quadros clínicos. Níveis elevados de TNF- α no baço associados aos de IL-10, contribuíram para a evolução e cronicidade da infecção (Stanley & Engwerda, 2007) ao impedirem o controlo da carga parasitária.

A IL-10 tem sido relacionada tradicionalmente com a progressão da LV em humanos (Karp *et al.*, 1993) e com a susceptibilidade à infecção do modelo murino (Melby *et al.*, 1998). Contudo, o seu papel na leishmaniose canina continua por determinar (Barbiéri, 2006; Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Enquanto Carrillo *et al.* (2007) detectaram uma diminuição da expressão nos PBMC estimulados com antígeno em cães oligossintomáticos experimentalmente infectados, no final do período de observação do nosso estudo observou-se um aumento significativo da produção de IL-10 pelas PBMC sem estimulação ou estimuladas com antígeno ou mitógeno, o que está de acordo com o trabalho de Pinelli *et al.* (1999). Estes autores detectaram níveis elevados de IL-10 nas células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) estimuladas com concanavalina A (conA) nos cães infectados. Embora Quinell *et al.* (2001) e Strauss-Ayali *et al.* (2007) não tenham observado diferenças na expressão desta citocina nos diferentes tecidos de cães naturalmente infectados ou

no baço de animais experimentalmente infectados, nos tecidos dos nossos animais a sua expressão, com excepção no fígado e na pele, foi significativamente diferente das outras citocinas. Nos esplenócitos, foi juntamente com a iNOS a citocina mais expressa, embora também se tenha detectado IFN- γ e TGF- β . Apesar de nosso estudo, tal como no de Strauss-Ayali *et al.* (2007), a resposta imunitária montada neste órgão seja do tipo Th1, as células do baço de cães naturalmente infectados apresentaram uma resposta mista com maior expressão de IL-10 e IFN- γ (Lage *et al.*, 2007) ou Th2 com maior produção de IL-10 e TGF- β (Corrêa *et al.*, 2007).

Apesar da expressão de IL-4 no sangue periférico nas fases iniciais da infecção (Sanchez-Robert *et al.*, 2008) assim como na medula (Quinnell *et al.*, 2001) ou em feridas na pele de cães naturalmente infectados (Brachelente *et al.*, 2005) terem sido relacionadas com o desenvolvimento da doença, o seu papel é ainda controverso (Carrillo *et al.*, 2007; Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Os linfócitos do sangue periférico de doentes com leishmaniose visceral activa produziram principalmente IFN- γ e quantidades discretas de IL-4 após estimulação antigénica específica (Coutinho *et al.*, 1996). A expressão desta duas citocinas pelos esplenócitos foram associadas à persistência do parasita em cães natural e experimentalmente infectados (Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Murganhos geneticamente manipulados, deficientes em IL-4 mostraram o papel desta citocina na resistência natural à infecção e na eficácia da terapêutica (Alexander *et al.*, 2000). No fim do período experimental a IL-4 não foi expressa em nenhum dos tecidos dos animais do nosso estudo. A sua ausência impediu o controlo da carga parasitária no fígado, provavelmente devido ao seu papel na formação dos granulomas hepáticos (Stager *et al.*, 2003).

A produção de TGF- β pelos macrófagos infectados *in vitro* aumentou significativamente no dia D180 em relação aos valores de referência do D0. Esta citocina tem um importante papel regulador na leishmaniose canina inibindo a activação dos macrófagos favorecendo a replicação parasitária (Gantt *et al.*, 2003) e evitando a resposta inflamatória (Gomes-Pereira *et al.*, 2004). Corrêa *et al.* (2007) observaram uma maior produção, por parte das células esplénicas, nos animais assintomáticos do que nos cães com sinais clínicos. Os autores associaram a sua presença com a inibição da produção de IFN- γ . As amostras ganglionares e as de sangue obtidas *post mortem* a partir dos animais do nosso estudo, foram as que mais expressaram TGF- β , não tendo sido detectada a produção de IFN- γ . Contudo, no baço

a expressão de ambas as citocinas foi idêntica. Strauss-Ayali *et al.* (2007) não detectaram diferenças na sua expressão antes e após infecção experimental.

Não foi possível detectar expressão de citocinas e iNOS em nenhuma das peles analisadas. Esta fase silenciosa também foi observada por Belkaid *et al.* (2002) na pele de murganhos infectados por *L. major*. No estudo realizado por Brachelente *et al.* (2005) a pele de todos os cães infectados naturalmente por *L. infantum* apresentaram uma resposta mista Th1 e Th2, com expressão de TNF- α , IFN- γ e IL-4. A expressão da IL-4 apresentou ainda uma associação positiva com a carga parasitária.

As células do gânglio poplíteo e da medula óssea foram as que expressaram um maior número de citocinas pelo que, tal como para o diagnóstico parasitológico, estes órgãos parecem ser as melhores alternativas para o estudo da imunidade celular.

A manifestação histopatológica clássica da leishmaniose canina caracteriza-se por uma reacção inflamatória crónica, acompanhada ou não da formação de granulomas ricos em macrófagos. Estas células, principalmente no fígado, baço, medula óssea e gânglios linfáticos, podem conter elevado número de amastigotas. A baixa carga parasitária nos diferentes tecidos pode dificultar a visualização do parasita (Tafuri *et al.*, 2004). Apesar dos vários órgãos analisados apresentarem uma elevada densidade parasitária, não se detectaram leishmanias em nenhum dos cortes histológicos. Uma maneira de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico histológico seria a utilização de métodos imunohistoquímicos (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Tafuri *et al.*, 2004).

As infecções experimentais por *L. donovani* caracterizam-se por diferentes respostas imunitárias específicas de cada órgão (Engwerda & Kaye, 2000). O fígado é o local onde ocorre a fase aguda da infecção, com posterior resolução, enquanto que o baço é o responsável pela persistência do parasita.

Apesar da hepatomegalia ser considerada um dos sinais comuns da leishmaniose canina, não foi observado em nenhum dos animais deste estudo assim como nos estudos realizados por Ciaramella *et al.* (1997), Koutinas *et al.* (1999) e Rallis *et al.* (2005). Embora macroscopicamente não se tenham observado alterações, a análise histopatológica do fígado permitiu concluir que os doze cães apresentavam hepatite intersticial granulomatosa difusa, por vezes acompanhada de ectasia dos vasos linfáticos. Apesar deste quadro estar descrito em cães com leishmaniose

(Molano *et al.*, 2003; Tafuri *et al.*, 2004; Poot *et al.*, 2005; Rallis *et al.*, 2005), Foster (2005) constatou que estas lesões inflamatórias, acompanhadas por flebite focal, granulomas e focos de necrose, ocorriam de forma espontânea, isto é, sem serem induzidas por acção de fármacos ou agentes patogénicos, em 95.0% dos cães de raça Beagle, com menos de dois anos e meio de idade, criados para fins experimentais. Apesar das alterações histopatológicas observadas, nenhum dos animais apresentava manifestações clínicas de falência hepática tais como ascite ou icterícia, as quais ocorrem em 2.5% dos animais naturalmente infectados (Slappendel, 1988). A vacuolização moderada e generalizada dos hepatócitos observada em 41.67% dos animais foi descrita em cães natural e experimentalmente infectados (Molano *et al.*, 2003; Rallis *et al.*, 2005). Lesões semelhantes podem ocorrer em animais por administração prolongada e excessiva de corticosteróides, no entanto, nenhum dos cães utilizados neste estudo foi submetido a corticoterapia.

Tal como observado por Oliveira *et al.* (1993), a esplenomegalia foi a única alteração macroscópica apresentada por todos os animais na necrópsia. Histologicamente, onze dos animais apresentavam esplenite granulomatosa difusa. Os granulomas, maiores que os do fígado, preenchiem significativamente a polpa vermelha. No estudo realizado por Alexandre-Pires *et al.* (2006), os autores verificaram que animais com leishmaniose apresentavam alterações histológicas esplénicas responsáveis pela redução da velocidade do fluxo sanguíneo através do baço; segundo os autores, estas alterações permitem que as células envolvidas nos processos imunológicos tenham tempo de proliferarem e de se diferenciar, para além de facilitar a captação de linfócitos. Na maioria dos animais observou-se ainda a presença de megacarioblastos e de pigmento hemático, indicando hematopoiese extramedular. A produção compensatória de macrófagos e de outras células fagocíticas, com concomitante aparecimento de esplenomegalia, é realizada à custa da deficiente eritropoiese com consequente desenvolvimento de anemia.

A linfadenomegalia, o sinal clínico mais observado ao longo do estudo, é consequência da hiperplasia dos folículos linfóides e da hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos da zona medular (Lima *et al.*, 2004). A carga parasitária nos gânglios hipertrofiados não se encontra associada com o tipo e severidade das lesões existentes (Lima *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008).

No final do período de observação somente em três animais se verificaram alterações cutâneas com infiltração perifolicular discreta e adenite sebácea, sendo estas manifestações semelhantes às observadas na leishmaniose canina (Brachelente *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2004; Saridomichelakis *et al.*, 2007). Apesar de dos-Santos *et al.* (2004) concluírem que as lesões de pele precedem a chegada de *L. chagasi* a este tecido, no nosso estudo o DNA parasitário foi amplificado em todas as amostras de pele demonstrando que as manifestações clínicas não são devidas exclusivamente à presença do parasita. O número de amastigotas pode ser semelhante em peles lesionadas e em peles saudáveis (Solano-Gallego *et al.*, 2004; Tafuri *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008). A escolha da pele do focinho para detecção do parasita deveu-se a ser, juntamente com a pele das orelhas, uma fonte útil para o diagnóstico da leishmaniose canina independentemente do quadro clínico do animal (Xavier *et al.*, 2006). A detecção de leishmanias na pele é de extrema importância uma vez ser a fonte de infecção para o vector e consequente transmissão do parasita. Apesar da ausência de sinais clínicos dermatológicos evidentes e da não observação de parasitas no exame histopatológico, foi possível detectar leishmanias (DNA) a partir da pele de todos os animais. O animal com a maior carga parasitária neste tecido foi o único cuja cultura de pele foi positiva. De acordo com Solano-Gallego *et al.* (2004), cães assintomáticos com resultado positivo de PCR mas sem amastigotas observados na pele, não têm importância epidemiológica na transmissão da infecção.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DE BALB/c COM ESTIRPE DE *L. infantum* TRATADA COM ANFOTERICINA B NA PRESENÇA DE GLÂNDULAS SALIVARES DE *Phlebotomus perniciosus*

3. Caracterização da infecção de BALB/c com estirpe de *L. infantum* tratada com anfotericina B na presença de glândulas salivares de *Phlebotomus perniciosus*

Os fármacos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose visceral continuam a ser os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B (AMB) (Seifert *et al.*, 2007; Gradoni *et al.*, 2008). A AMB tem sido utilizada principalmente após falha terapêutica com os antimoniais e em casos de co-infecção *Leishmania*-HIV, principalmente no Sudoeste da Europa.

A AMB apresenta uma elevada afinidade pelo ergosterol, o principal esteroide da parede do parasita *Leishmania* e não pelo colesterol, o esteroide predominante nas células dos hospedeiros vertebrados. Apesar de existirem poucos estudos acerca da emergência de resistência do parasita à AMB (Croft *et al.*, 2006), a possibilidade do aparecimento de estirpes resistentes não deve ser minimizada, tendo em conta que a percentagem de cura nos indivíduos imunodeprimidos varia entre os 58.0 e 82.0% com frequentes recaídas (Alvar *et al.*, 2008). Também se deve ter em conta a pressão exercida, no continente Europeu, pelos proprietários de cães na utilização deste fármaco para o tratamento da leishmaniose canina (Al-Mohammed *et al.*, 2005).

A saliva do vector inoculada no hospedeiro, juntamente com *Leishmania*, possui diversas moléculas imunomoduladoras e antihemostáticas que levam ao aumento da carga parasitária e do tamanho da lesão cutânea (Titus & Ribeiro, 1988; Belkaid *et al.*, 1998; Rohousová & Volf, 2006). A saliva, além de inibir a activação das células T (Titus, 1998; Rohousová *et al.*, 2005) e algumas das funções dos macrófagos incluindo o stresse oxidativo (Gillespie *et al.*, 2000), a produção de NO (Hall & Titus, 1995; Katz *et al.*, 2000) e a produção e expressão de citocinas (Costa *et al.*, 2004).

3.1. Material e Métodos

3.1.1. Animais

Foram utilizados murganhos (*Mus musculus*) fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, pertencentes à estirpe BALB/c provenientes da Harlan Interfauna Ibérica, Espanha, mantidas no Biotério do IHMT em condições climáticas controladas e nutrição adequada, de acordo com as normas comunitárias relativas ao bem-estar dos animais de experiência transpostas para a lei nacional. Os animais desta estirpe são considerados como “sensíveis” à infecção por *Leishmania* por possuírem o alelo sensível do gene *Nramp1* no loci *Lsh* (*Lsh^s*).

3.1.2. Parasitas

Para a infecção dos murganhos e dos macrófagos *in vitro* foi usada a estirpe *L. infantum* MON-1, MCAN/PT/05/IMT373. Os promastigotas utilizados nas inoculações pertenciam à estirpe selvagem ou a culturas de alto rendimento tratadas com 160 ng/ml de anfotericina B (AMB-Fugizone ®, Bristol-Myers Squibb, Portugal). A selecção de parasitas tratados com AMB foram obtidos através do aumento gradual de 20ng da concentração de AMB por ml do meio de cultura. A concentração do fármaco era aumentada quando o número de parasitas sobre pressão era semelhante ao número dos parasitas na cultura sem fármaco, selvagem (Seifert *et al.*, 2003).

Os promastigotas metacíclicos foram obtidos como descrito por Howard *et al.* (1987, 1991). Resumidamente, os parasitas foram cultivados durante 10 dias em meio Schneider/FCS nas condições anteriormente descritas (2.1.2.).

3.1.3. Glândulas salivares de *P. perniciosus*

A colónia de *P. perniciosus* é mantida no insectário do laboratório de Parasitologia, Faculty of Science, Charles University, Praga, República Checa segundo a metodologia recomendada por R. Killick-Kendrick & M. Killick-Kendrick (1991).

O extracto de glândulas salivares de fêmeas de *P. perniciosus* foi realizado como descrito por Rohousová *et al.* (2005) e executado pela Doutora Vera Volfová.

As glândulas, isoladas de fêmeas com 5 a 10 dias de vida não alimentadas com sangue, foram dissecadas em tampão Tris (20 mM Tris, pH 7.6). Grupos de 20 glândulas em 20 µl de Tris foram conservadas a -70°C até serem utilizadas.

3.1.4. Inoculação

Antes de serem inoculados, os animais foram sedados com 150 mg de ketamina (Imalgene® 1000, Rhône Mérieux, Portugal) e 15 mg de xilazina a 2% (Rompun®, Bayer, Portugal), por kilo do animal administrado por via intraperitoneal (i.p.).

Este estudo abrangeu 112 murganhos inoculados com um volume de 5 µl por via intradérmica na orelha direita e divididos em 4 grupos:

- Grupo 373W: inoculado com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* IMT373 – Estirpe selvagem
- Grupo 373WSG: inoculado com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* IMT373 e com o extracto de uma glândula salivar de *P. perniciosus*.
- Grupo 373R160SG: inoculado com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* IMT373 tratados com 160ng/ml de AMB e com o extracto de uma glândula salivar de *P. perniciosus*.
- Grupo Controlo (C): inoculado com soro fisiológico 0.09% e com uma glândula salivar de *P. perniciosus*.

3.1.5. Recolha de Material Biológico

Aos dias 7, 14, 28, 42, 56, 84 e 112 após inoculação foram sacrificados 4 animais de cada grupo por “overdose” da mistura anestésica descrita em 3.1.4. A cada animal foram retirados sangue, os macrófagos peritoneais, as orelhas, o gânglio linfático regional, baço, fígado e um fémur para colheita da medula óssea.

As amostras biológicas recolhidas foram utilizadas para inoculação em meio de cultura (baço e fígado), para extracção de DNA (para quantificação do parasitismo por qRT-PCR) e de RNA (para quantificação relativa da expressão de citocinas por qRT-PCR), para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por CIE (sangue) e para proliferação linfocitária (baço). O baço e fígado de cada animal foram macerados em 2 ml e 5 ml de meio RMPI, respectivamente, antes de serem utilizadas nos diferentes procedimentos. A extracção da medula óssea do fémur foi realizada com uma agulha de 25G em seringa contendo 1ml de RPMI. Os macrófagos peritoneais de cada grupo

foram utilizados em “pool” para medir a produção de óxido nítrico e para as infecções *in vitro*.

3.1.6. Estudos Parasitológicos

Exame Cultural

Em cada tubo de meio de NNN adicionaram-se 100 µl de macerado de fígado ou de baço aos quais se acrescentou 1 ml de soro fisiológico 0.09%. As culturas foram observadas semanalmente como descrito em 2.1.7.2.

3.1.7. Estudos Moleculares

Determinação da carga parasitária por qRT-PCR

A extracção de DNA das amostras foi realizada conforme descrito em 2.1.10.1. A metodologia para quantificação da carga parasitária por qRT-PCR está descrita em 2.1.10.4.

3.1.8. Estudos Imunológicos

3.1.8.1 Imunidade Humoral

Contraimuno-electroforese

As amostras de sangue recolhidas ao longo do estudo foram analisadas conforme descrito em 2.1.8.2.

3.1.8.2. Imunidade Celular

3.1.8.2.1. Proliferação Linfocitária

Nos dias D7, D14, D28, D42 e D56, o baço de cada grupo de animais, juntos em “pool”, foram macerados e homogeneizados em meio RPMI e a resultante suspensão celular foi lavada a 290 g durante 10 minutos a +4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e o sedimento ressuspendido em 4 ml de RPMI. A suspensão celular foi colocada lentamente sobre meio de Ficoll, numa proporção de 2 ml da suspensão celular para 4 ml de Ficoll, e centrifugada a 580 g, durante 20 minutos à temperatura ambiente. O anel de células mononucleadas foi recolhido e processado de acordo com o referido no ponto 2.1.9.1.

A cultura das células *in vitro* e a proliferação foram realizadas como descrito em 2.1.9.2. e 2.1.9.1., respectivamente.

No presente estudo, tendo em conta os resultados de IE obtidos no Grupo C em resposta ao antigénio (IE máximo de 1.1) considerou-se positivo um resultado de IE \geq 1.5.

3.1.8.2.2. Estudo da expressão de citocinas por qRT-PCR

A extracção do RNA e a sua transcrição reversa foram realizados conforme descrito em 2.1.9.3.

As amostras de cDNA foram analisadas usando os oligonucleótidos comercializados pela Applied Biosystems. Como o gene da desidrogenase fosfato gluceraldeído (GAPDH), uma das enzimas envolvidas na cadeia de lise de glucose, foi usado como gene de referência, não foi necessário quantificar o RNA total extraído, já que a expressão génica foi sempre referenciada em relação ao controlo endógeno.

As expressões das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α , TGF- β e da iNOS foram quantificadas usando o método comparativo de quantificação relativa. Este tipo de quantificação, em tempo real, elimina diferenças inerentes à fase estacionária de amplificação, durante a qual os componentes da reacção se tornam limitantes para a amplificação do produto. Por esta razão o valor de Ct (“cycle threshold”), que corresponde ao ciclo em que se inicia a fase exponencial da amplificação da reacção de PCR, é a medida mais fiável da quantidade inicial de cDNA. O método permite calcular a quantidade do gene-alvo amplificado face à expressão de um gene de referência. O gene da GAPDH foi usado como controlo endógeno neste estudo, tendo apresentado eficiência de amplificação semelhante aos genes alvo.

A expressão das citocinas e da iNOS foram “normalizadas” relativamente à expressão da GAPDH.

A expressão das citocinas e da iNOS nos grupos 373W, 373WSG e 373R160SG foram normalizadas relativamente ao grupo controlo.

3.1.8.2.3. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais

Isolamento dos macrófagos peritoneais

Após sacrifício do animal, e em todos os dias de recolha, inocularam-se por via i.p. 10 ml de RPMI/FCS 10%. Os lavados peritoneais de cada grupo de animais obtidos após massagem abdominal foram juntos em “pool” e centrifugados a 200 g, 5 minutos a +4°C e o sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI/FCS 10 %. A contagem de células viáveis realizou-se por coloração das células com azul de Tripán, tendo sido ajustada a concentração para 2×10^6 células mononucleadas/ml.

Cultura *in vitro* dos macrófagos peritoneais

Foram realizadas culturas *in vitro* dos macrófagos peritoneais. As culturas celulares foram incubadas sem estimulação, com estimulação pelo lipopolissacarido de *Escherichia coli* (LPS, Sigma) com estimulação pelo antígeno (Ag) parasitário específico ou com co-estimulação pelo LPS e Ag.

Em placas de 96 poços de fundo em U, foram colocados 150 µl por poço das suspensões celulares. Às células para estimulação foram adicionados, por poço, 10 µg/ml de antígeno total de *Leishmania* (preparado como descrito em 2.1.2.1), 1.5 µg/ml de uma solução de LPS (no poço) ou 0.75 µg/ml de LPS (no poço) mais 5 µg/ml de Ag (no poço). Nas células não estimuladas adicionaram-se 50 µl de meio RPMI/FCS 10 %, perfazendo assim um total de 200 µl em cada poço da placa. Em seguida, as células foram incubadas a +37 °C, 5 % CO₂ em atmosfera húmida durante 48 horas.

Medição de nitritos

Os sobrenadantes foram recolhidos ao fim das 48 horas de incubação e a medição dos nitritos foi realizada como descrito em 2.1.9.4.

3.1.9. Infecção *in vitro* dos macrófagos peritoneais e determinação da susceptibilidade dos parasitas à anfotericina B

No D112, foram colocados por poço, em placas de 8 poços Lab Tek, 0.3 ml da suspensão celular de macrófagos isolados como descrito em 2.1.9.4. e incubou-se a +37°C, 5% de CO₂ durante 24h de modo a permitir a sua aderência. No dia seguinte, as células foram infectadas com promastigotas na fase estacionária de *L. infantum*

IMT373 tratados com 160ng/ml de AMB na proporção parasita:macrófago 5:1. Após 24 horas de incubação a +37°C, 5% CO₂, os poços foram lavados duas vezes com PBS de modo a remover os parasitas não fagocitados e adicionaram-se, em sete dos poços, diluições seriadas 1:4 entre 2000 e 1.95 µg/ml de AMB. Ao oitavo poço adicionou-se RMPI/FCS 10% de modo a servir de controlo de infecção. Após 24 horas de incubação a +37°C, 5% de CO₂, o índice inibitório do crescimento dos parasitas em 50% (IC₅₀) foi determinado utilizando o corante fluorescente DAPI (Vectashield mounting médium with DAPI, Vector Laboratories, USA) que cora o núcleo das células viáveis de azul fluorescente.

3.1.10. Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada no programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., USA). O teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar: ao longo do período de observação (i) a carga parasitária entre os diferentes órgãos de cada grupo de murganhos; (ii) a carga parasitária entre os três grupos; (iii) a expressão de citocinas nos diferentes tecidos de cada grupo; (iv) a expressão de citocinas nos diferentes tecidos entre os três grupos; assim como para avaliar (v) a proliferação linfocitária e a produção de óxido nítrico, nos quatro grupos de murganhos em estudo. Quando a hipótese nula foi rejeitada, múltiplas comparações de Friedman foram realizadas para determinar qual o tecido ou citocina que foi estatisticamente diferente, utilizando um nível de significância de 5% (Mello, 1997). O teste de Spearman foi utilizado para determinar o coeficiente de correlação entre a carga parasitária e a expressão de citocinas nos diferentes tecidos de cada grupo de murganhos, utilizando um nível de significância de 1%.

3.2. Resultados

Os resultados deste trabalho foram apresentados num colóquio realizado na Faculty of Science, Charles University (Praga, Abril 2008).

3.2.1. Estudos Parasitológicos

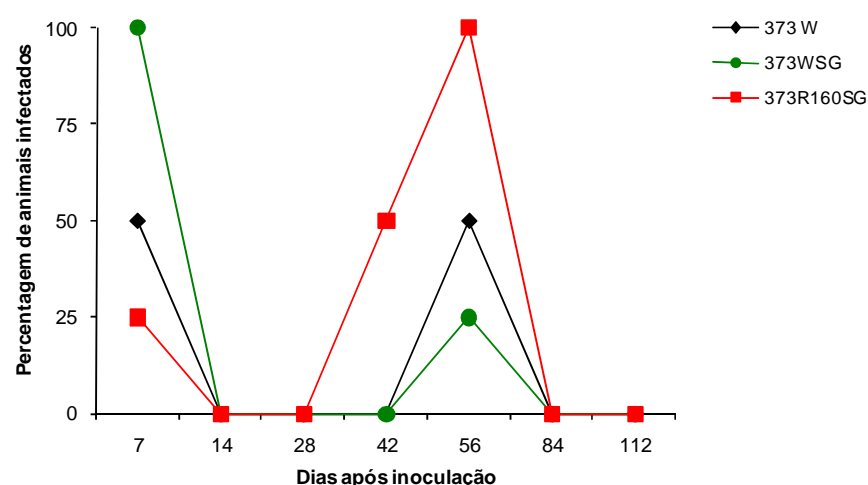
As culturas das amostras de baço e de fígado recolhidas dos murganhos dos quatro grupos estudados (C, 373W, 373WSG e 373R160SG) foram negativas durante todo o período experimental.

3.2.2. Determinação da carga parasitária por qRT-PCR

Pela técnica de qRT-PCR detectou-se DNA parasitário nos D7, D42 e D56. As amostras de todos os animais dos diferentes grupos foram negativas nos D14, D28, D84 e D112 (Figura 3.1).

No D7 esta técnica detectou parasitas em amostras provenientes dos quatro animais do grupo 373WSG, em dois do grupo 373W e em um do grupo 373R160SG. No D56 foi amplificado DNA de *L. infantum* em todos os animais deste último grupo, em dois do grupo 373W e em um do grupo 373WSG. Não se verificaram diferenças significativas entre a CP dos diferentes grupos durante o tempo experimental.

Figura 3.1. Detecção do DNA parasitário por percentagem de animais dos grupos 373W, 373WSG e 373R160SG nos 112 dias após inoculação.

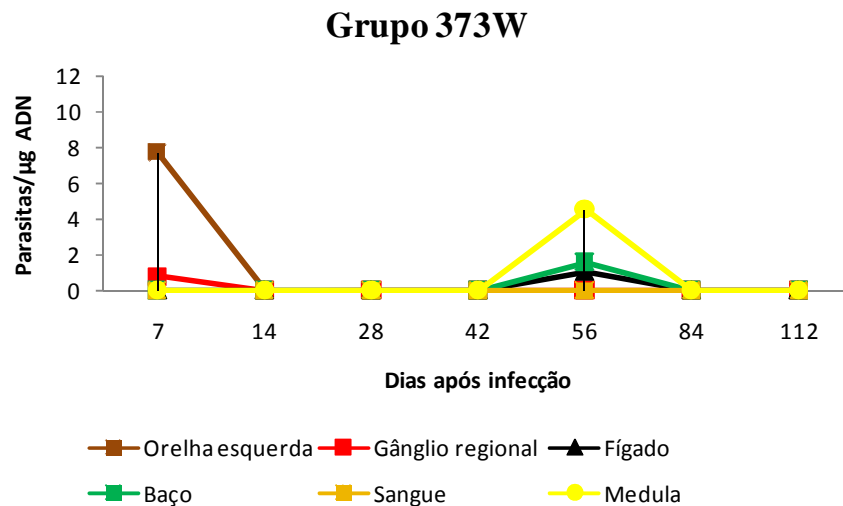


Não ocorreu parasitismo no grupo C durante todo o tempo de estudo.

Grupo 373W

No sétimo dia após inoculação, a carga parasitária (CP) nos animais do grupo 373W foi mais elevada na orelha direita (104,83 parasitas/ μ g DNA), local de inoculação, do que na esquerda e do que no gânglio regional (Figura 3.2). Nestes locais não foram detectados parasitas nos restantes dias de necrópsia. No D56 apenas se detectaram parasitas nos órgãos internos. As amostras do sangue periférico mantiveram-se negativas durante todo o período experimental.

Figura 3.2. Evolução da carga parasitária na orelha esquerda, gânglio regional, sangue, fígado, baço e medula óssea dos murganhos do grupo 373W ao longo do tempo de observação.

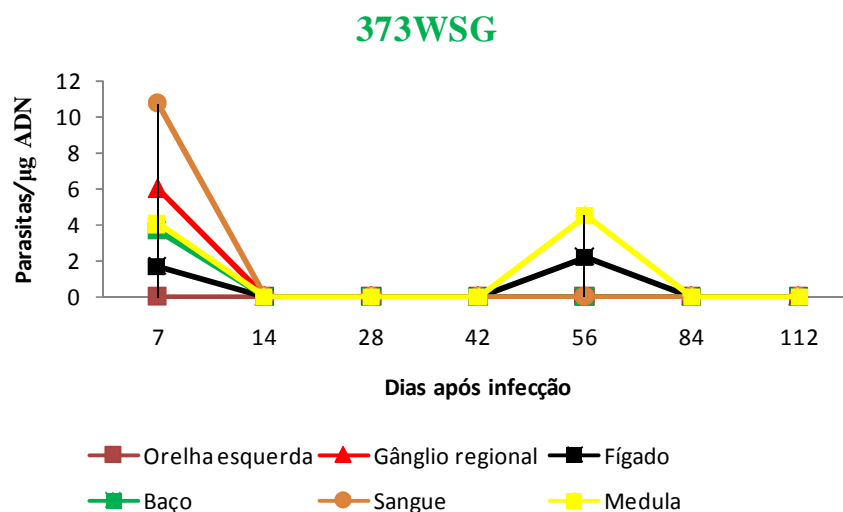


A CP da orelha direita está omitida no gráfico de modo a permitir a visualização nos outros órgãos.

Grupo 373WSG

No grupo 373WSG, a cinética da CP no local de inoculação (orelha direita) foi semelhante ao grupo 373W, mas o número de parasitas no gânglio regional foi superior neste grupo. Sete dias após inoculação verificou-se a presença de DNA parasitário no sangue assim como nos órgãos internos (Figura 3.3). A carga parasitária na medula e no fígado foi idêntica à observada no grupo 373W no D56, sendo a medula o tecido mais parasitado.

Figura 3.3. Evolução da carga parasitária na orelha esquerda, gânglio regional, sangue, fígado, baço e medula óssea dos murganhos do grupo 373WSG ao longo do período de observação.



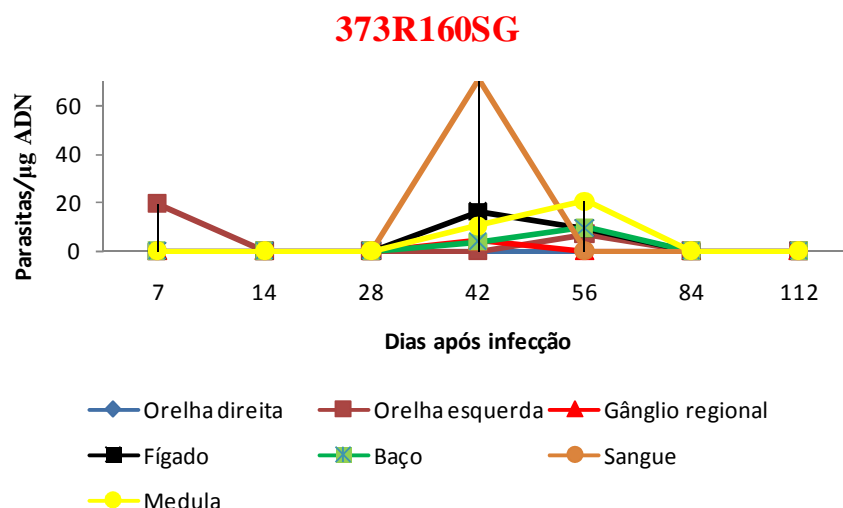
O valor da CP da orelha direita do D7 foi 87,41 parasitas/μg DNA. A CP da orelha direita está omitida no gráfico de modo a permitir a visualização nos outros órgãos.

Grupo 373R160SG

No grupo 373R160SG, sete dias após inoculação detectaram-se parasitas na orelha esquerda, tal como no grupo 373W (Figura 3.4).

No D42 o DNA parasitário foi identificado no gânglio regional, no sangue e nos órgãos internos. As amostras com maior densidade parasitária foram as do sangue. Enquanto nas amostras de sangue e de fígado o pico de concentração parasitária foi no D42, nas amostras medulares e esplénicas foi no D56.

Figura 3.4. Evolução da carga parasitária nas orelhas direita e esquerda, gânglio regional, sangue, fígado, baço e medula óssea dos murganhos do grupo 373R160SG ao longo do período de observação.



3.2.3. Estudos seroimunológicos

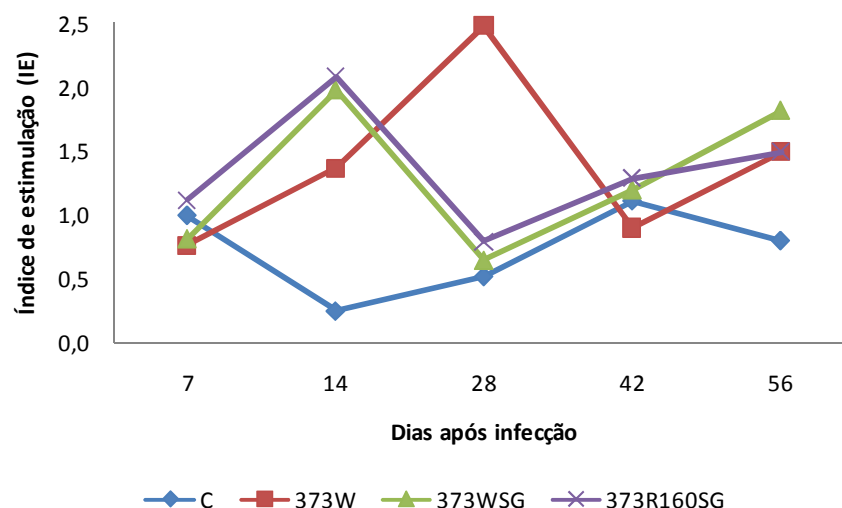
Em nenhum dos murganhos estudados se detectou anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de CIE.

3.2.4. Estudos da Imunidade celular

3.2.4.1. Proliferação linfocitária

Os linfócitos dos animais dos grupos 373WSG e 373R160SG foram os primeiros a proliferarem em resposta à estimulação antigénica, no D14. Por outro lado, foi no grupo 373W que se observou a maior resposta proliferativa das células mononucleares esplénicas à estimulação com o antígeno (Ag) de *Leishmania* (IE 2.5) no D28 (Figura 3.5). No grupo C não houve resposta proliferativa ao Ag ao longo de todo o período experimental. Não se detectaram diferenças significativas na proliferação das células em resposta ao antígeno nos grupos não tratados e no grupo tratado.

Figura 3.5. Resposta proliferativa dos linfócitos extraídos do baço dos murganhos dos grupos C, 373W, 373WSG e 373R160SG ao antígeno parasitário, durante o período experimental.

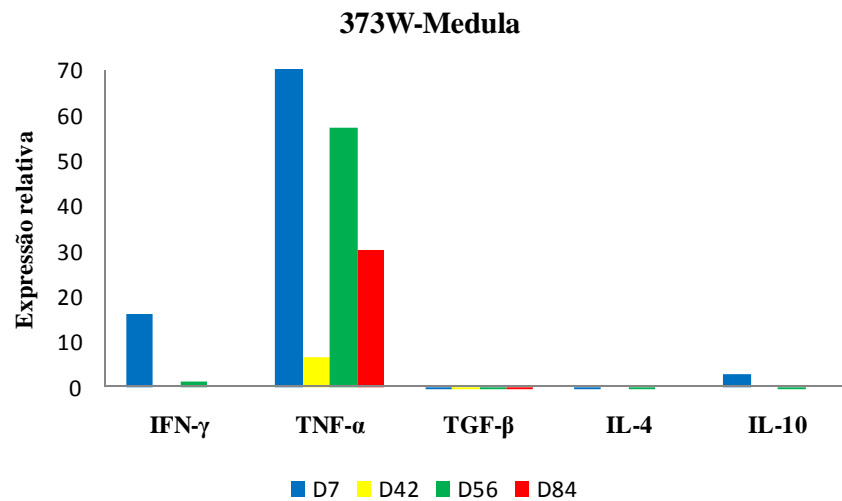


3.2.4.2. Expressão de citocinas

Grupo 373W

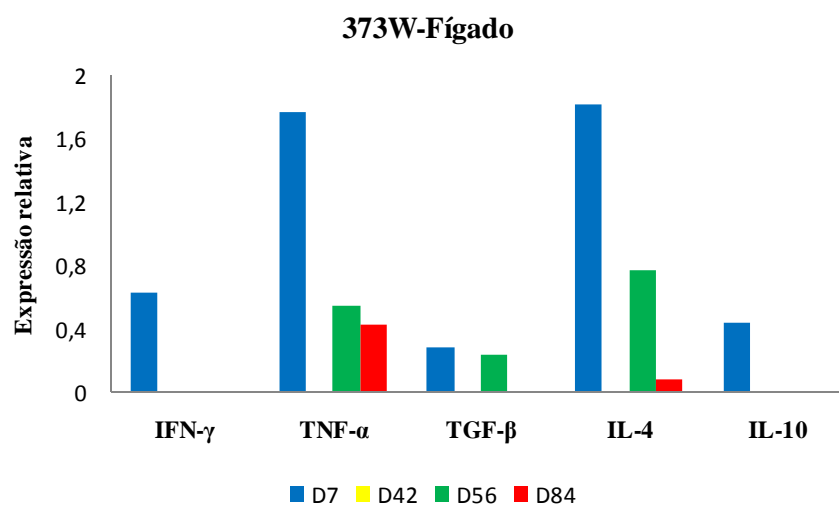
Ao longo do período de observação, a expressão das citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-10 e TNF- α pelas células da medula óssea do grupo 373W apresentou diferenças significativas entre si ($p < 0.05$) (Figura 3.6). A citocina com maior expressão foi o TNF- α . A expressão do IFN- γ foi superior às expressões do TGF- β , IL-4 e IL-10 e correlacionada positivamente com as duas últimas ($r_s = 1$). Verificou-se um aumento de expressão de IL-4, IL-10 e IFN- γ nos dias D7 (valor máximo) e D56 com ausência nos outros dias (D42 e D84). A expressão do TGF- β foi inferior à de IL-4 e IL-10, assim como a da IL-4 foi inferior em relação à IL-10 tendo-se observado uma correlação positiva entre estas ($r_s = 1$).

Figura 3.6. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4 e IL-10 pela medula óssea dos animais do grupo 373W nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.



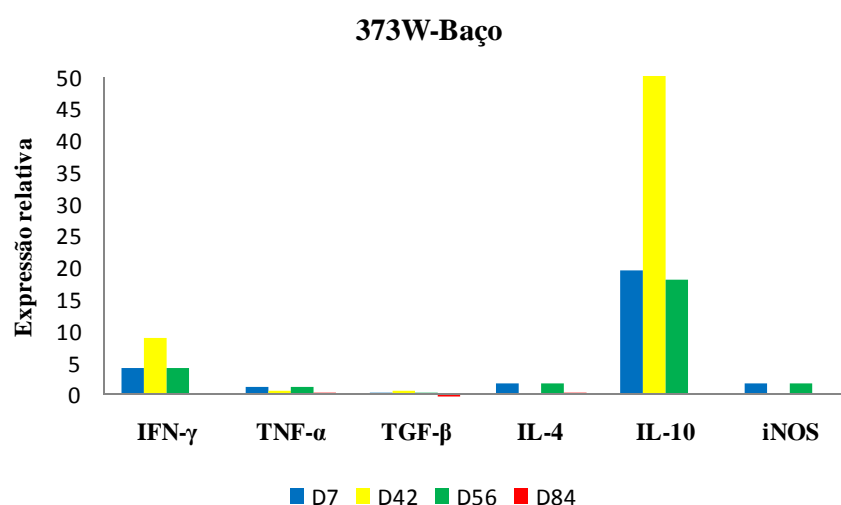
Com exceção da IL-4 e IL-10, a expressão das demais citocinas pelas células hepáticas apresentou diferenças significativas entre elas ($p < 0.05$) (Figura 3.7). Detectou-se uma correlação positiva entre a expressão de INF- γ e de IL-10, as quais apenas foram detectadas no D7, e entre o TNF- α e a IL-4. Apesar destas duas citocinas terem sido detectadas nos dias D7, D56 e D84, a expressão máxima ocorreu sete dias após inoculação.

Figura 3.7. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4 e IL-10 pelo fígado dos animais do grupo 373W nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.



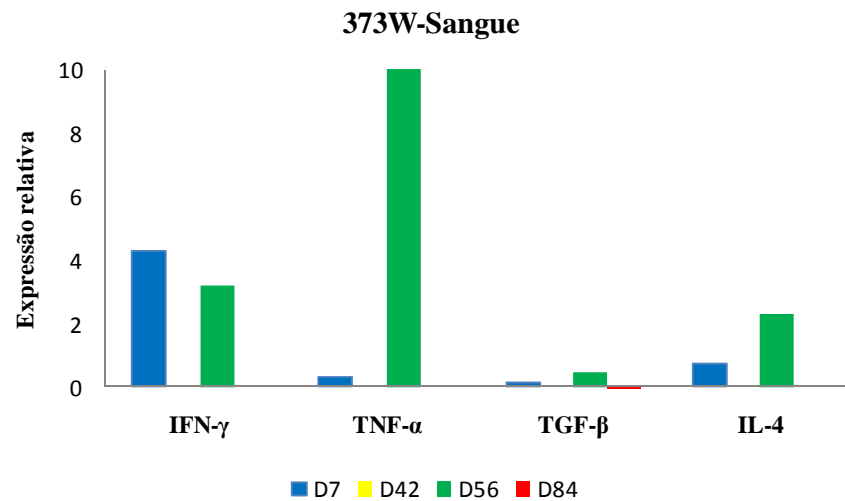
A expressão de IL-10 pelos esplenócitos correlacionou-se positivamente com a de TGF- β ($rs=1$) tendo sido máxima no D42 (Figura 3.8). As expressões de IL-4, TNF- α e iNOS apresentaram idêntica cinética ao longo do período de observação não apresentando diferenças significativas entre si ($p=0.051$).

Figura 3.8. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 e iNOS pelo baço dos animais do grupo 373W nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.



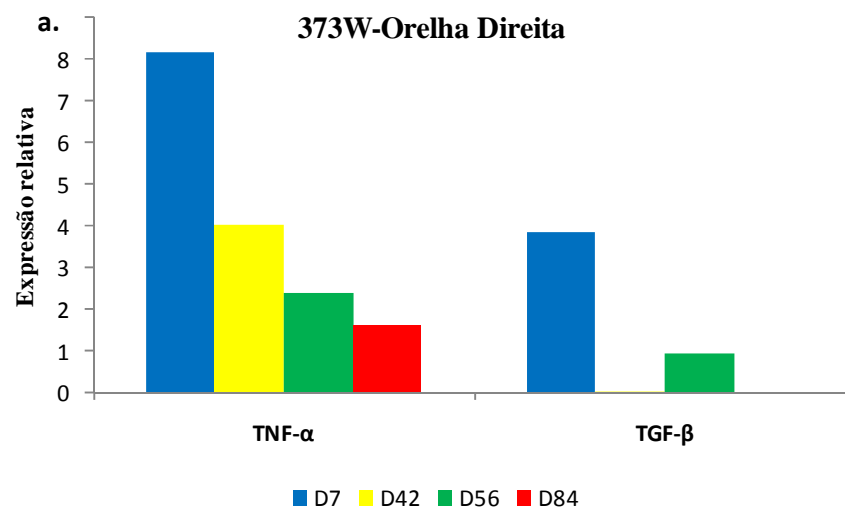
A expressão de TNF- α pelas células do sangue periférico apresentou uma correlação positiva com a de IL-4 ($rs=1$) (figura 3.9). Estas duas citocinas apresentaram ainda uma cinética de expressão semelhante à da TGF- β ($p=0.051$).

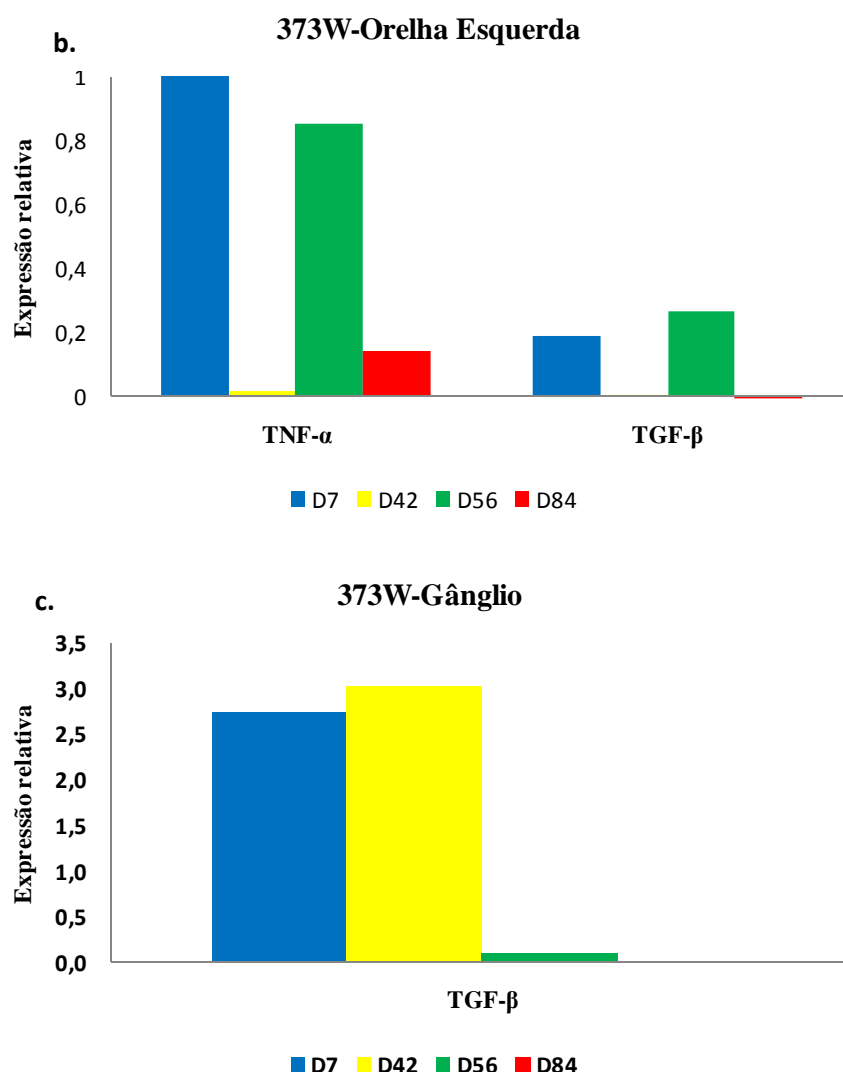
Figura 3.9. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-4 pelo sangue periférico dos animais do grupo 373W nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.



Não se verificou diferenças significativas nem correlação entre a expressão das citocinas e iNOS pelas células de ambas as orelhas e do gânglio linfático regional (Figura 3.10).

Figura 3.10. Expressão relativa das citocinas TNF- α e TGF- β pela orelha direita (a.), orelha esquerda (b.) e gânglio linfático regional (c.) dos animais do grupo 373W nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.





Grupo 373WSG

No grupo 373WSG não se verificaram diferenças significativas entre a expressão das várias citocinas e iNOS em nenhum dos órgãos. Contudo, a expressão de IL-10 pelos hepatócitos apresentou uma correlação positiva com a expressão de IL-4 e TGF- β ($r_s=1$) (Figura 3.11a). A correlação entre IL-10 e IL-4 também foi observada nas células esplénicas ($r_s=1$) (Figura 3.11b). O pico de expressão destas duas citocinas pelas células do fígado ocorreu no D7 enquanto que a detecção máxima no baço foi no D56. A cinética da iNOS nos esplenócitos foi semelhante à do TNF- α , com o pico máximo no D84.

Relativamente às células do sangue periférico, a expressão de IFN- γ apresentou uma correlação positiva com a de IL-4 ($rs=1$) tendo sido ambas detectadas no D7 e D56 (Figura 3.12).

Figura 3.11. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 e iNOS pelo fígado (a.) e baço (b.) dos animais do grupo 373WSG nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.

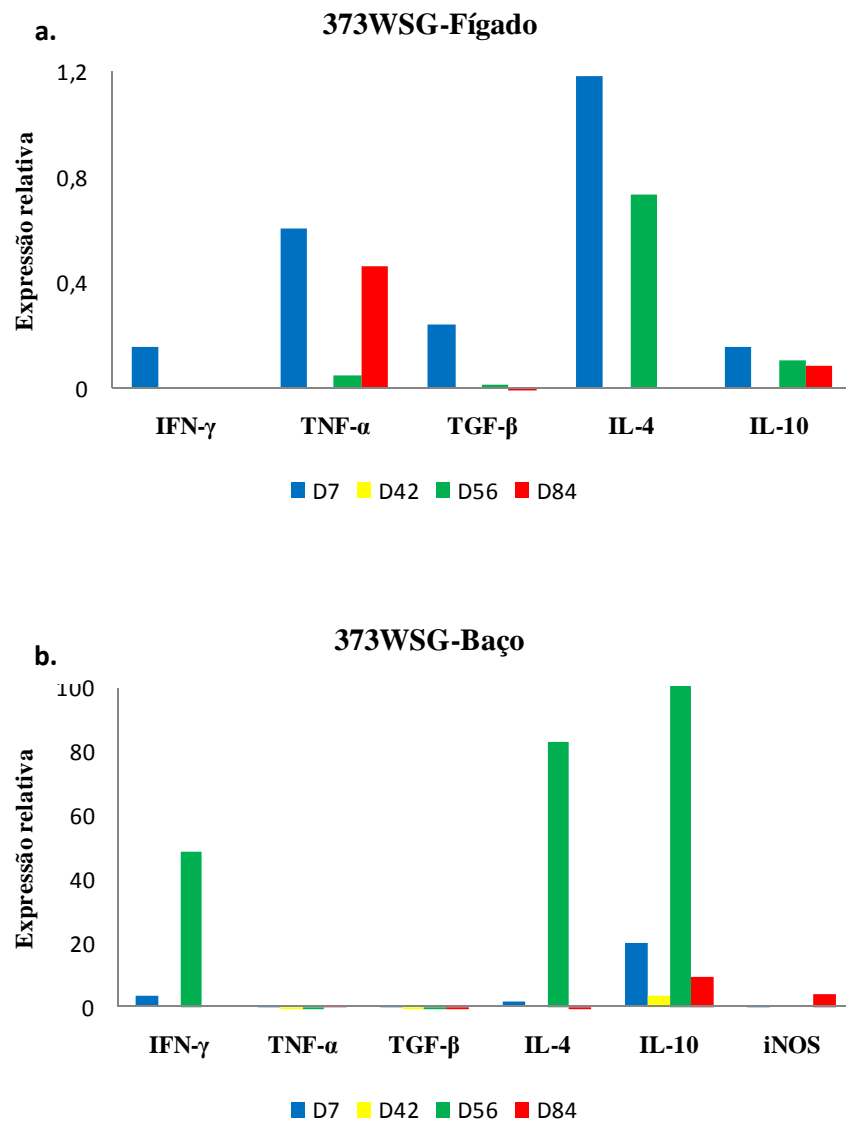
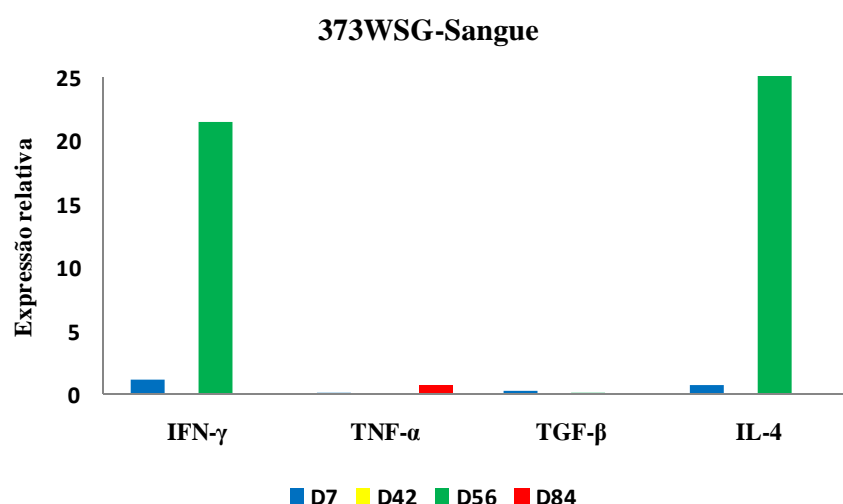
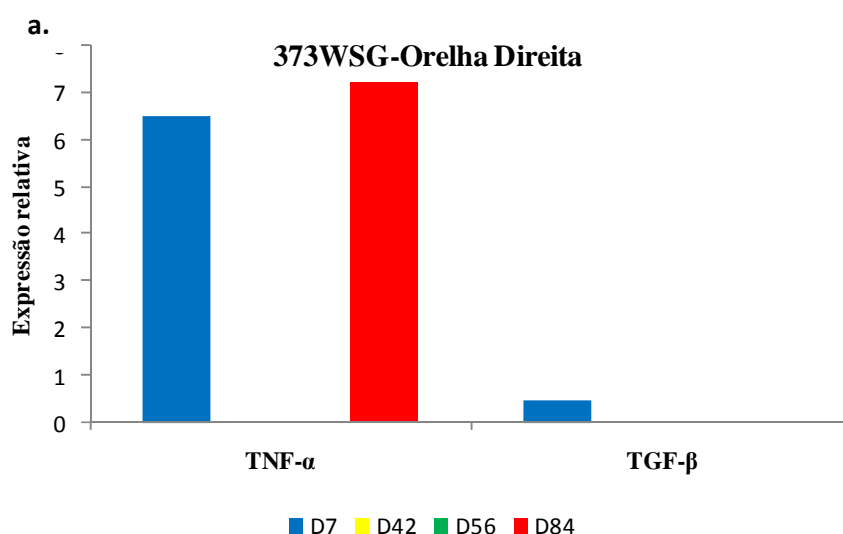


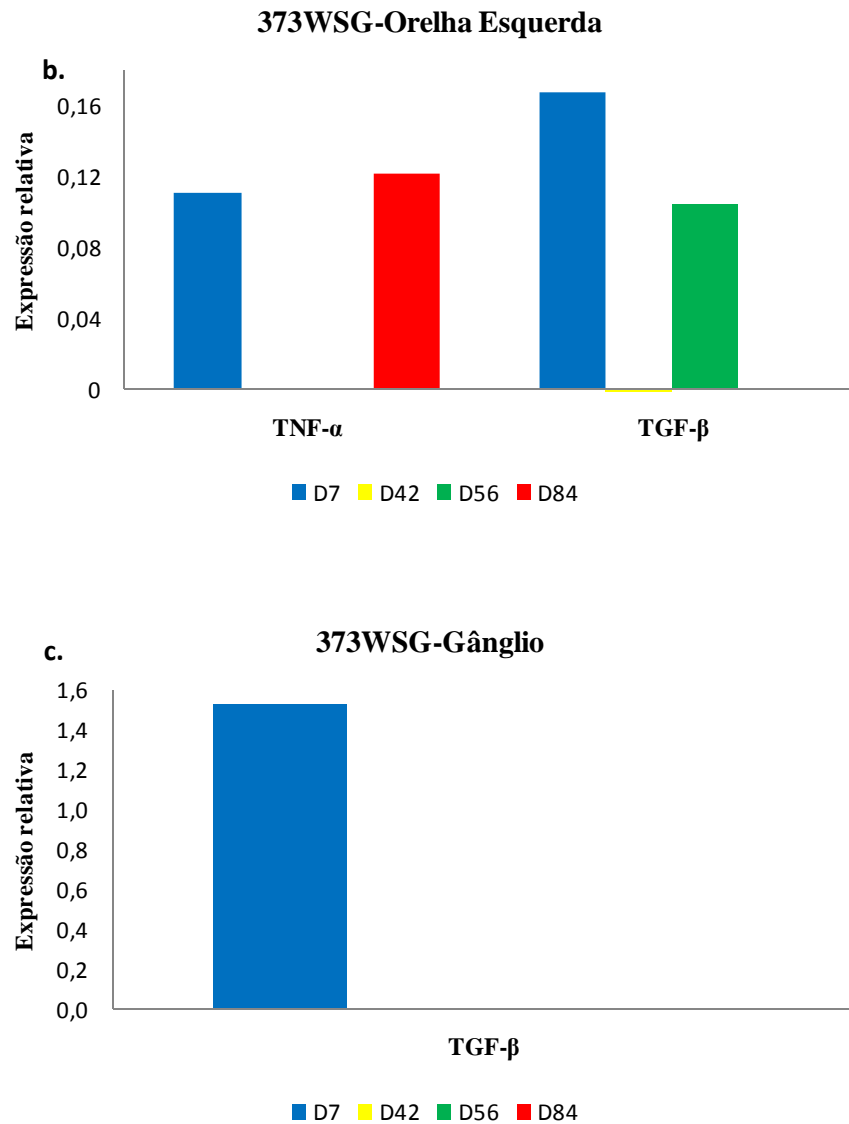
Figura 3.12. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 e iNOS pelo sangue periférico dos animais do grupo 373WSG nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.



A Figura 3.13 representa a expressão das citocinas produzidas pelas células das orelhas direita (a.) esquerda (b.) e gânglio regional (c.).

Figura 3.13. Expressão relativa das citocinas TNF- α e TGF- β pela orelha direita (a.), esquerda (b.), gânglio linfático regional (c.) dos animais do grupo 373WSG nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.





A análise estatística realizada revelou ainda a existência de uma correlação positiva entre a cinética da carga parasitária (CP) do gânglio regional e a expressão de TGF- β ($r_s=1$) e entre a cinética da CP da medula e a expressão de IL-10 ($r_s=1$).

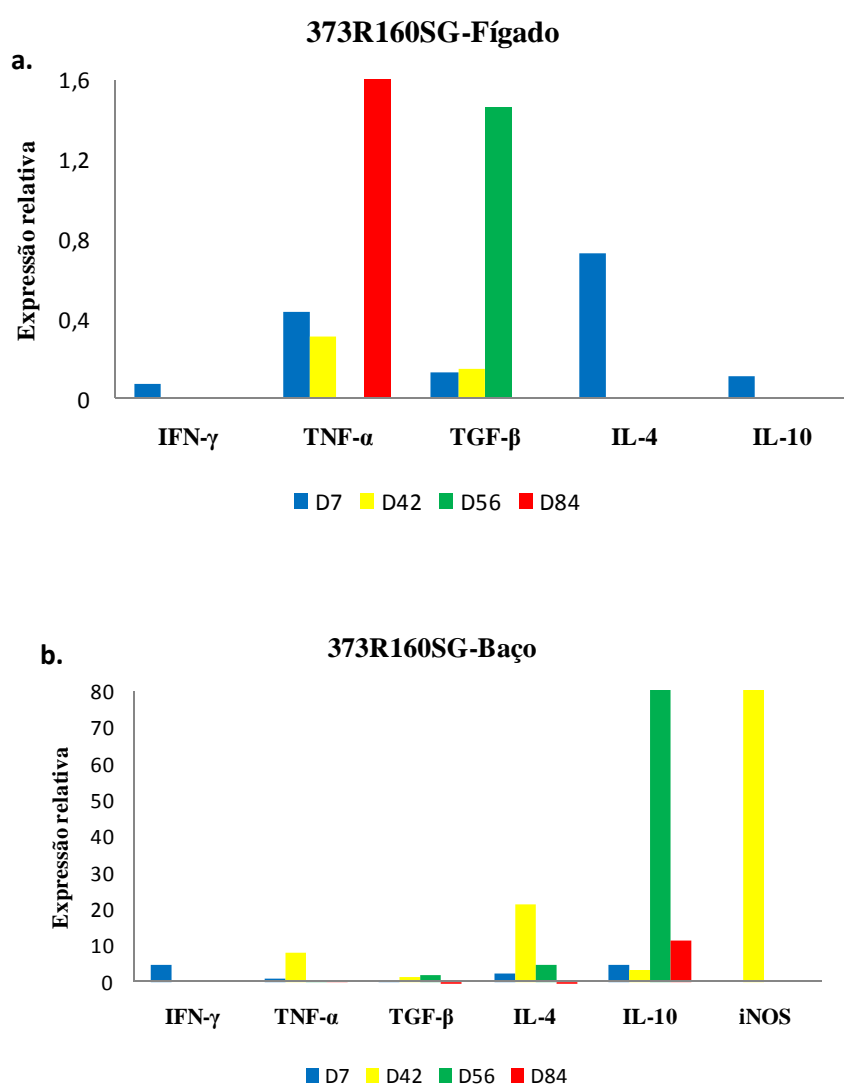
Não se verificou correlação entre as citocinas expressas pelas células de ambas as orelhas.

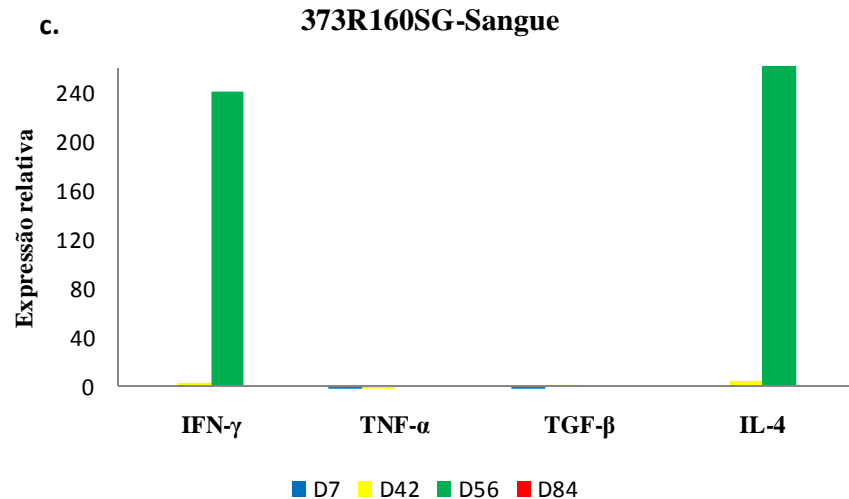
Grupo 373R160SG

Nos órgãos dos animais deste grupo, tal como no 373WSG, não se detectaram diferenças significativas entre a expressão das diferentes citocinas ou iNOS em cada órgão e entre os diferentes órgãos. Não houve correlação entre a expressão de citocinas com a CP das orelhas, do gânglio e da medula óssea.

A expressão de TNF- α , nas células hepáticas (Figura 3.14a) e nos esplenócitos (Figura 3.14b), apresentou uma correlação negativa em relação à expressão de TGF- β e de IL-10, respectivamente ($r_s=1$). Nos hepatócitos, a expressão de IL-10 estava correlacionada positivamente à de IL-4 e IFN- γ ($r_s=1$). A cinética de expressão de IFN- γ pelas células do sangue periférico apresentou uma correlação positiva estatisticamente significativa com a cinética da IL-4 ($r_s=1$) (Figura 3.14c).

Figura 3.14. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 e iNOS pelo fígado (a.), baço (b.) e sangue periférico (c.) dos animais do grupo 373R160SG nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.

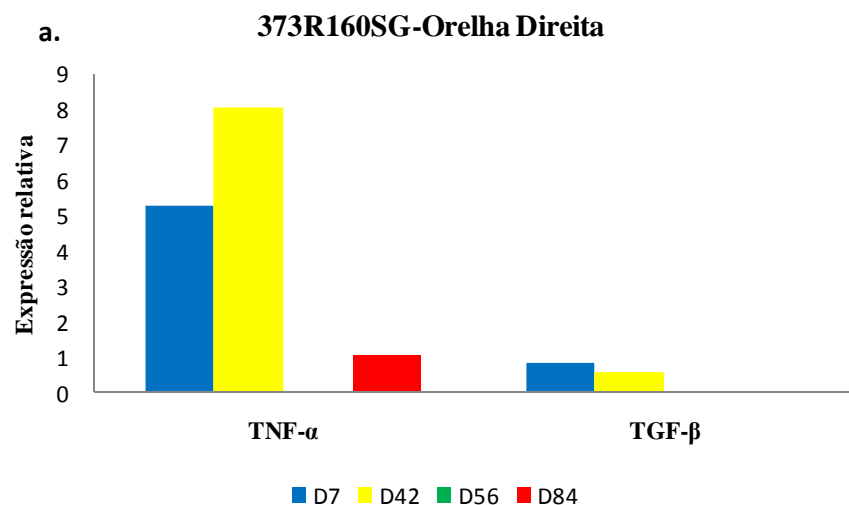


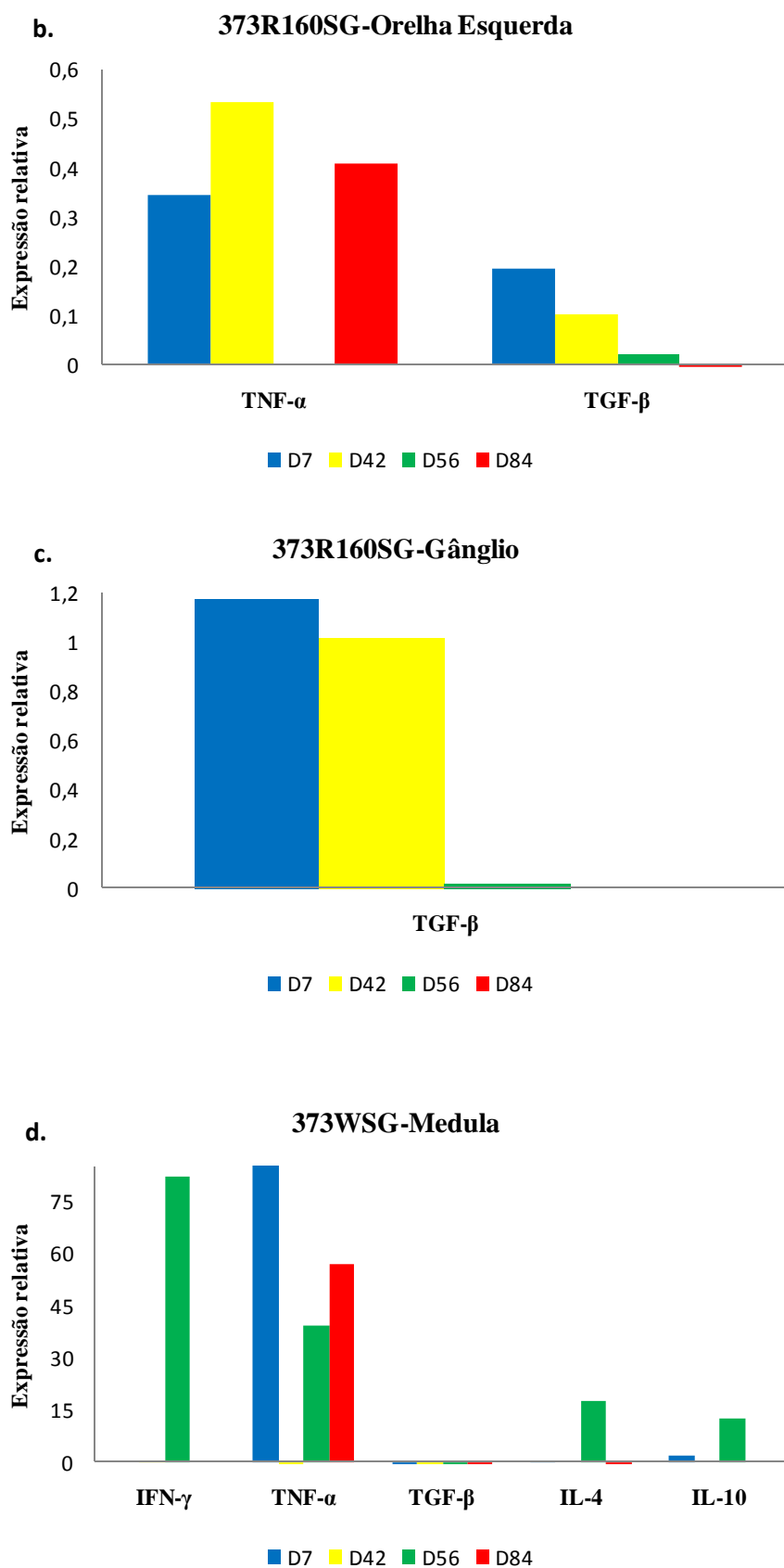


A expressão de TGF- β pelas células esplénicas deste grupo de animais foi significativamente superior à dos grupos 373W e 373WSG. O pico de expressão desta citocina ocorreu no D7, aquando da detecção do maior número de parasitas no baço.

A Figura 3.15 representa a expressão das citocinas produzidas pelas células das orelhas direita (a.) esquerda (b.), gânglio regional (c.) e medula óssea (d.)

Figura 3.15. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4 e IL-10 pela orelha direita (a.), esquerda (b.), gânglio linfático regional (c.) e medula óssea (d.) dos animais do grupo 373R160SG nos dias D7, D42, D56 e D84 após inoculação.





No quadro 3.1 está representado, de uma forma esquemática, a correlação entre a expressão média das citocinas produzidas pelas células dos diferentes órgãos dos animais necropsiados.

Quadro 3.1. Correlação da expressão de citocinas pelas células dos diferentes órgãos dos três grupos de animais infectados com *L. infantum*.

Órgão/Tecido	Grupos de murganhos infectados com <i>Leishmania infantum</i>		
	373W	373WSG	373R160SG
Orelha Direita	s.c.	s.c.	s.c.
Orelha Esquerda	s.c.	s.c.	s.c.
Gânglio	s.c.	s.c.	s.c.
Fígado	IFN γ e IL10 (+)	IL10 e IL4 (+)	IL10 e IL4 (+) IFN γ e IL10 (+)
	TNF α e IL10 (+)	IL10 e TGF β (+)	TNF α e TGF β (-) TNF α e IL10 (-)
Baço	IL10 e TGF- β (+)	IL10 e IL4 (+) TNF α e iNOS (+)	TNF α e TGF β (-) TNF α e IL10 (-)
Sangue	TNF α e IL4 (+)	IFN γ e IL4 (+)	IFN γ e IL4 (+)
Medula	IFN γ e IL10 (+)	s.c.	s.c.
	IFN γ e IL4 (+)	s.c.	s.c.
	IL10 e IL4 (+)	s.c.	s.c.

s.c.: sem correlação; (+): correlação positiva; (-): correlação negativa

A expressão das citocinas e iNOS dos restantes órgãos não foi determinada porque o gene constitutivo GAPDH não foi expresso.

3.2.4.3. Produção de óxido nítrico

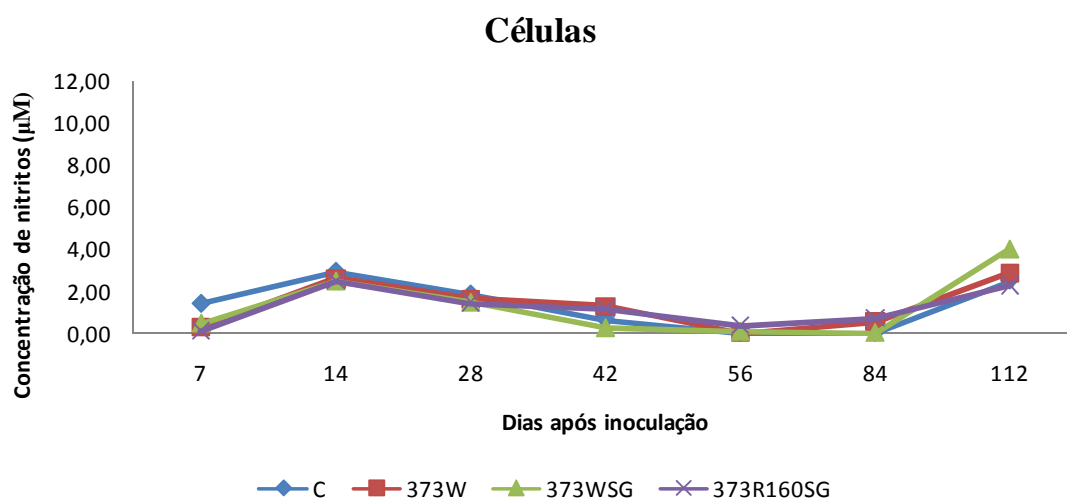
A determinação da concentração de nitritos no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais permitiu avaliar o estado de activação dos macrófagos.

A produção de nitritos pelos macrófagos dos animais dos quatro grupos cultivados na ausência de estímulo externo, não ultrapassou as 2 mM, excepto no D112 (Figura 3.16a). Apesar de no D14 se ter observado a produção máxima de nitritos (4 mM) em resposta ao antigénio pelos macrófagos dos três grupos inoculados com o parasita, a activação das células também ocorreu nos D28, D56 e D112 (Figure 3.16b). No grupo C não houve valores de NO igual ou superior a 2 mM em resposta ao Ag ao longo de todo o período experimental.

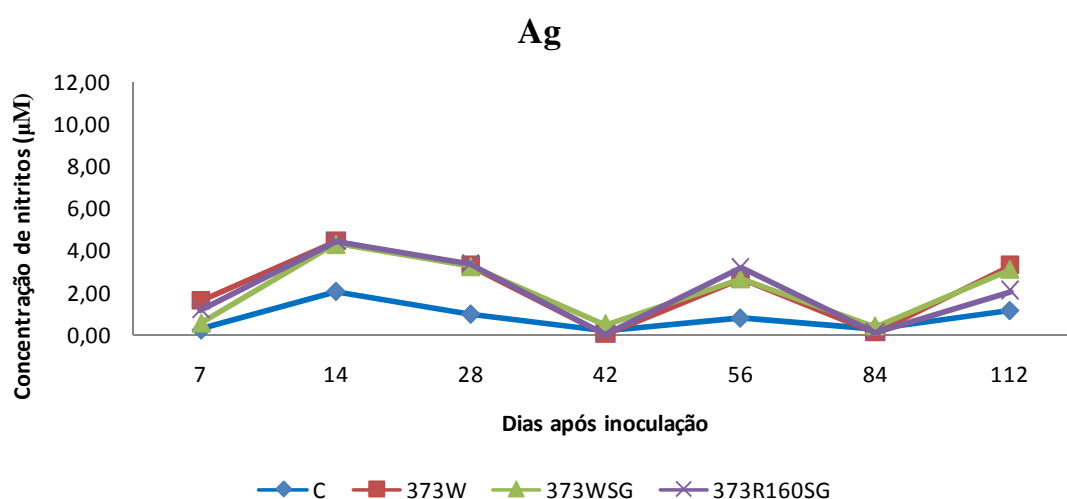
As concentrações obtidas no grupo 373R160SG com estimulação de LPS e LPS+Ag foram superiores às observadas nos outros três grupos (Figuras 3.16c e 3.16d).

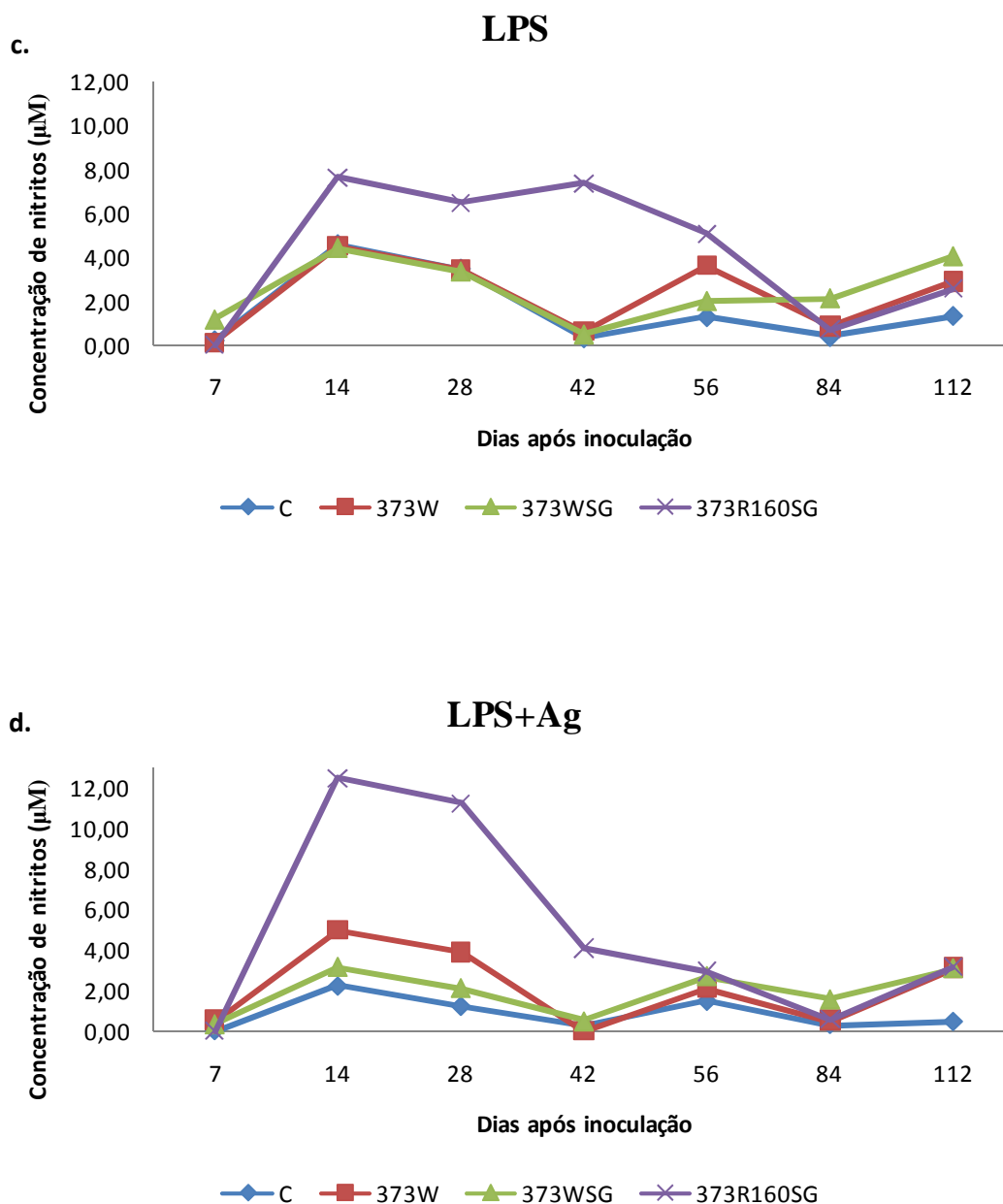
Figura 3.16. Produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos murganhos dos grupos C, 373W, 373WSG e 373R160SG cultivados sem estimulação (a.) ou estimulados com antígeno parasitário (Ag) (b.), ou com lipofosfoglicano (LPS) (c.) ou com ambos (LPS+Ag) (d.) nos 112 dias após inoculação.

a.



b.

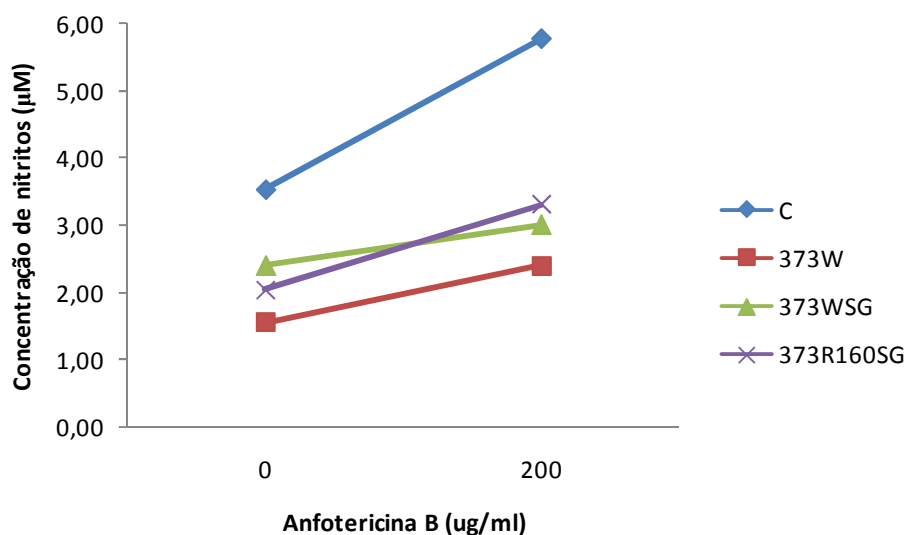




3.2.5. Determinação da susceptibilidade dos macrófagos peritoneais à anfotericina B

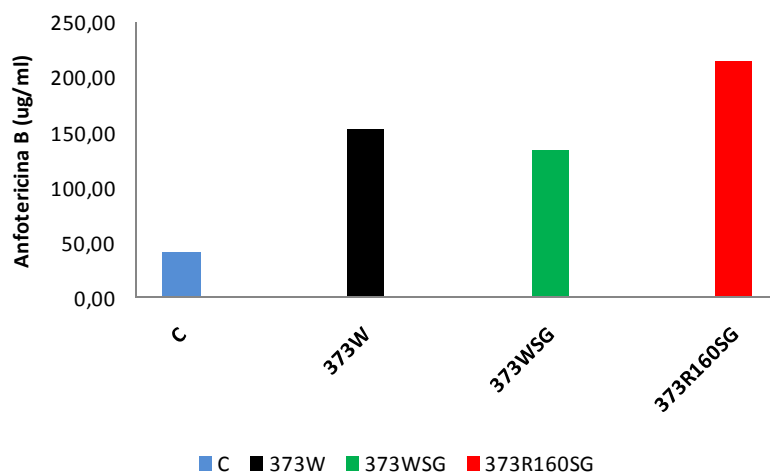
Os macrófagos peritoneais dos animais dos diferentes grupos isolados no D112 foram infectados com promatigotas de *L. infantum* IMT373 tratados com 160 ng/ml de anfotericina B (373R160) e incubados com diluições seriadas de AMB. Após 24 horas de incubação, recolheram-se os sobrenadantes para medição da produção de nitritos (Figura 3.17) e determinou-se a dose de fármaco necessária para inibir o crescimento dos parasitas em 50% (Figura 3.18).

Figura 3.17. Produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos murganhos dos grupos C, 373W, 373WSG e 373R160SG recolhidos no 112º dia, infectados com *L. infantum* 373R160 e tratados com diluições seriadas de anfotericina B.



Os macrófagos peritoneais do grupo C produziram mais nitritos do que as células dos murganhos infectados com a concentração máxima de 5.77 µM observada nos macrófagos tratados com 200 µg/ml de AMB.

Figura 3.18. Determinação do índice de inibição em 50% do crescimento dos parasitas na presença de anfotericina B em macrófagos peritoneais de BALB/c dos grupos C, 373W, 373WSG e 373R160SG recolhidos 112 dias após inoculação.



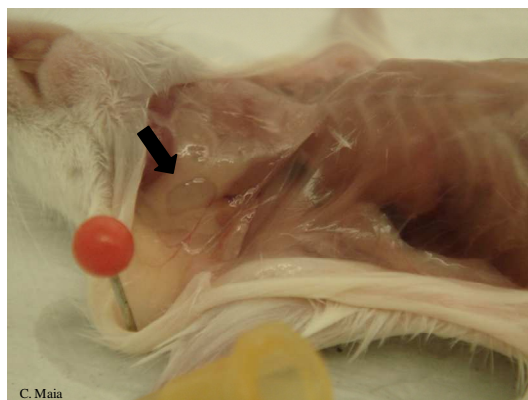
Os macrófagos dos animais do grupo 373R160SG foram os que necessitaram de uma maior concentração de anfotericina B para reduzir em 50% o crescimento dos parasitas. O IC₅₀ dos grupos 373W e 373WSG foram semelhantes, apesar do grupo inoculado com saliva necessitar de uma dose inferior de fármaco.

Os macrófagos do grupo C foram os que apresentaram o menor IC₅₀, cerca de um quarto do valor do grupo 373R160SG.

3.2.6. Observação clínica e mortalidade

Nos D7 e D14 os animais dos grupos 373W, 373WSG e 373R160SG apresentaram linfadenopatia regional (Figura 3.19). Não foi observado nenhum outro sinal clínico durante o resto do estudo. A taxa de mortalidade foi de 0 %.

Figura 3.19. Linfadenopatia regional observada 14 dias após inoculação.



3.3. Discussão

O largo espectro fenotípico das leishmanioses está dependente da espécie infectante, da resposta imunológica e das características genéticas do hospedeiro. O modelo murino tem contribuído para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela patogénese e pela resposta imunitária à infecção por *Leishmania*.

A distribuição do parasita no organismo, a resposta imunitária assim como o quadro clínico da doença são também influenciados pela via de inoculação e o número de parasitas inoculados (Titus & Ribeiro, 1988; Melby *et al.*, 1998; Streit *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003; Rolão *et al.*, 2004b). Nas infecções experimentais de leishmaniose visceral as vias endovenosa e intraperitoneal são as mais utilizadas para

inoculação dos parasitas (Miralles *et al.*, 1994; Leclercq *et al.*, 1996; Wilson & Weinstock, 1996; Bories *et al.*, 1998; Rolão *et al.*, 2004b, 2007). Embora as vias subcutânea (SC) e intradérmica (ID) sejam as mais próximas do que ocorre na natureza com a picada do vector, existem poucos estudos com a sua utilização. Melby *et al.* (1998) inocularam por via SC formas amastigotas de *L. donovani* (5×10^6 /animal) no membro posterior de BALB/c mas os parasitas apenas mostraram uma disseminação para os gânglios linfáticos regionais, não tendo sido encontradas leishmanias nos órgãos internos durante os 56 dias p.i.. Resultado semelhante foi obtido por Streit *et al.* (2001) após inoculação SC de formas promastigotas de *L. infantum*/*L. chagasi* (10^7 /animal) no dorso dos murganhos. Esta via de inoculação foi, provavelmente, a responsável pelo controlo da infecção durante as 8 semanas de observação. Os esplenócitos dos animais infectados proliferaram em resposta ao antígeno de *Leishmania* e observou-se o desenvolvimento de uma resposta imunitária do tipo Th1 com aumento da expressão de ARNm de IFN- γ , IL-12 e iNOS e supressão da produção de TGF- β . Contudo, no trabalho realizado por Nuwayri-Salti *et al.* (1998) verificou-se a visceralização da infecção 13 meses após a inoculação SC de murganhos com promastigotas de *L. donovani* (7×10^6 /animal).

No nosso estudo, a inoculação ID de 10^7 promastigotas por animal resultou na visceralização da infecção nos três grupos inoculados com *L. infantum*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Ahmed *et al.* (2003) que observaram parasitas no fígado e baço de murganhos uma semana após a inoculação ID de *L. infantum*. A concentração de promastigotas utilizada deveu-se ao facto da maioria das infecções experimentais em modelo murino com espécies viscerotrópicas de *Leishmania*, assim como no único estudo a usar a via ID (Ahmed *et al.*, 2003) utilizarem este número de parasitas (Olivier *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1991; Miralles *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2002; Rolão *et al.*, 2007). A utilização de uma concentração diferente impediria a comparação dos nossos resultados com os dos outros autores.

Neste estudo, os animais co-inoculados com promastigotas da estirpe selvagem de *L. infantum* e o extracto de uma glândula salivar (373WSG), visceralizaram uma semana após inoculação (p.i.) enquanto que o grupo inoculado apenas com os parasitas (373W), só apresentou disseminação para os órgãos internos no D56. Esta precocidade na visceralização da infecção poder-se-à dever à presença da saliva do vector, como demonstrado em outros estudos onde a co-inoculação de

parasitas com a saliva de flebótomos resultou na exacerbação da infecção (Titus & Ribeiro, 1988; Belkaid *et al.*, 1998; Norsworthy *et al.*, 2004; Kamhawi, 2006). Apesar da disseminação para os órgãos internos ter acontecido mais cedo do que no grupo 373W, não se detectaram diferenças significativas na carga parasitária (CP), entre os três grupos de animais infectados, ao longo do período de observação. Resultados idênticos foram obtidos por Ahmed *et al.* (2003) e Paranhos-Silva *et al.* (2003) ao co-inocularem murganhos e cães com *L. infantum*/*L. chagasi* e o extracto de uma glândula salivar de *Phlebotomus perniciosus* ou *Lutzomyia longipalpis*, respectivamente.

No presente trabalho, a inexistência de diferenças na gravidade da infecção entre os dois grupos pode ter sido causada por variações na composição salivar já observada anteriormente entre diferentes colónias de flebótomos da mesma espécie (Warburg *et al.*, 1994; Volf *et al.*, 2008). Infecções de diferentes modelos animais com flebótomos naturalmente infectados, ou com diferentes concentrações de extracto salivar e/ou com o gel secretado pelos promastigotas no interior do vector, poderão elucidar sobre os factores de virulência presentes na saliva responsáveis pela gravidade da infecção por *Leishmania* assim como a sua importância no desenvolvimento de produtos vacinais (Ahmed *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2006; Bates, 2007; Kimblin *et al.*, 2008).

Em 1998, Mbongo *et al.* inocularam BALB/c, por via intraocular, com 10⁸ promastigotas de *L. donovani* resistentes à anfotericina B (AMB), mas apenas foram isolados parasitas no fígado e no baço dos animais do grupo controlo, inoculados com a estirpe selvagem. O nosso grupo co-inoculado com parasitas tratados com AMB e saliva (373R160SG) apresentou uma disseminação da infecção para os órgãos internos no D42, anterior à do grupo inoculado com a estirpe selvagem. A presença da saliva parecer ter facilitado a dispersão dos parasitas desde o local de inoculação até aos órgãos internos, contudo a visceralização foi mais lenta no grupo inoculado com promastigotas resistentes à anfotericina B do que nos animais co-inoculados com a estirpe selvagem e extracto de uma glândula salivar (373WSG). Este atraso na propagação da infecção poderá ter sido devido à multiplicação mais lenta dos parasitas tratados com o fármaco. Al-Mohammed *et al.* (2005) observaram que o desenvolvimento de lesões cutâneas em murganhos inoculados com promastigotas de *L. mexicana* resistentes à AMB era mais demorado, e concluíram que esta diferença

se devia provavelmente à incapacidade dos amastigotas com o fenótipo de resistência se dividirem ao mesmo ritmo que os do grupo controlo.

A CP no dia D7 no local de inoculação foi semelhante nos grupos 373W e 373WSG apresentando uma concentração mais elevada de parasitas do que na orelha esquerda e do que o gânglio linfático. A elevada expressão de TNF- α nestes tecidos terá sido a responsável de não se ter amplificado DNA parasitário nesta região até ao fim de período experimental. No grupo 373R160SG não se detectaram parasitas no local de inoculação nem no gânglio regional no D7 provavelmente devido à expressão de TGF- β nestes tecidos ter sido menor do que a observada nos outros dois grupos infectados, traduzindo-se numa resposta mais eficiente do sistema imunitário, com controlo local da infecção. Sete dias após inoculação verificou-se ainda a presença de DNA parasitário no sangue periférico assim como nos órgãos internos dos animais do grupo 373WSG sendo a carga parasitária mais elevada na circulação sanguínea. A disseminação precoce da infecção para os órgãos internos poderá estar associada à saliva uma vez que é a única variável em relação ao grupo 373W. O facto de apenas os grupos co-inoculados com parasitas e saliva terem apresentado parasitemia reforça o observado por outros autores, de que as propriedades imunodepressoras dos componentes salivares favorecem a multiplicação dos parasitas (Rohousova & Volf, 2006) e como nós verificámos a disseminação precoce para os órgãos internos.

Na experiência efectuada por Ahmed *et al.* (2003), o gânglio linfático regional foi o órgão mais parasitado ao longo de todo o período de observação seguido do baço, fígado e pele. No nosso estudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na carga parasitária entre os diferentes órgãos analisados. Este resultado, assim como o obtido por Ahmed *et al.* (2003), foram contrários aos obtidos por outros autores que sugerem o baço como o órgão mais susceptível à multiplicação dos parasitas de estirpes viscerotrópicas (Engwerda *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2003; Riça-Capela *et al.*, 2003; Rolão *et al.*, 2007). Mesmo em infecções experimentais que utilizem a mesma espécie de *Leishmania*, o mesmo modelo animal e o mesmo tipo de inoculação, a evolução do parasitismo pode ser influenciada pela virulência da estirpe utilizada ou mesmo do isolado utilizado. De facto, é hoje aceite que cada isolado de *Leishmania* possui uma estrutura policlonal, constituída por populações heterogéneas de diferente virulência e, consequentemente, com distinta capacidade de estabelecer a infecção (Garin *et al.*, 2001; Mendez *et al.*, 2001).

Em todos os grupos a CP nas orelhas e gânglio diminuiu ao longo do tempo de infecção excepto no grupo 373R160SG onde foram observados parasitas na orelha esquerda dois meses p.i. (D56). A presença de parasitas tratados com AMB na pele permite levantar a hipótese de estes possuírem uma maior capacidade de adaptação ao hospedeiro, favorecendo a sua transmissão ao vector. Pelo que a transmissão de parasitas tratados com anfotericina poderá ocorrer na Natureza.

Não se isolou o parasita por cultura de amostras de baço e de fígado recolhidas dos murganhos dos quatro grupos ao longo dos 112 dias p.i.. Uma vez mais a sensibilidade desta técnica foi inferior à técnica molecular. Apesar de ter sido utilizada a técnica de qRT-PCR para detecção de parasitas, nos dias D14, D28, D84 e D112 não foi amplificado DNA parasitário nos animais sacrificados. Embora a distribuição das leishmanias nos tecidos não seja homogénea, este problema foi obviado pela maceração dos órgãos previamente à extracção de DNA. Uma explicação para a ausência de DNA parasitário poderá ser o alojamento dos parasitas em tecidos que não foram analisados como por exemplo pele e gânglios linfáticos de outras regiões anatómicas.

Para avaliar a resposta imunitária humoral foi realizado neste trabalho a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de contraimuno-electroforese no soro dos animais dos quatro grupos estudados não tendo sido detectados em nenhum dos murganhos utilizados no estudo. Zovein *et al.* (1984) infectaram murganhos, por via SC, com *L. donovani* e associaram a não produção de títulos significativos de anticorpos ao não desenvolvimento de lesões no local de inoculação durante todo o período experimental (22 semanas). Paranhos-Silva *et al.* (2003) obtiveram resultados idênticos ao inocularem Beagle com *L. infantum*/*L. chagasi* por via intradérmica, não detectando anticorpos específicos no soro destes animais durante todo o período de experimentação. Contudo, tal como no nosso estudo, detectaram DNA parasitário nos órgãos internos. Tal como ocorre na leishmaniose visceral humana e canina, a maioria dos indivíduos expostos ao parasita conseguem controlar a infecção não apresentando sinais clínicos e permanecendo seronegativos. Num inquérito epidemiológico realizado por Solano-Gallego *et al.* (2001b), em 63% dos cães com PCR positivo, apenas 26% eram seropositivos e 13% apresentavam sintomatologia.

O estudo de proliferação linfocitária realizado demonstrou que, tal como observado no modelo canino, não houve imunossupressão dos linfócitos esplénicos devido à infecção. A resposta celular manteve-se positiva de forma intermitente ao

longo do estudo e, esteve relacionada com a não detecção de parasitas, excepto no D56. Os nossos resultados contrastam com os de outros autores, onde as células dos órgãos internos infectados dos modelos roedores não proliferaram em resposta ao antígeno específico (Riça-Capela *et al.*, 2003; Rolão *et al.*, 2007). A resposta proliferativa ao antígeno no D56 poderá ser responsável pela não detecção de parasitas nos dias seguintes (D84 e D112); o mesmo se verificou entre os dias D14 e D56 (grupos 373W e 373WSG), e entre os dias D14 e D42 (grupo 373R160SG). A não detecção de parasitas nesses dias poderá também estar relacionada com a maior produção de NO observada pelos macrófagos peritoneais em resposta ao antígeno.

No fim do período de observação, os macrófagos peritoneais dos quatro grupos foram infectados, *in vitro*, com a estirpe 373R160 e tratados com AMB. As células de todos os grupos foram permissivas à infecção com esta estirpe, resultado idêntico ao obtidos por Mbongo *et al.* (1998) ao infectar o mesmo tipo de células com promastigotas de *L. donovani* resistentes à AMB. Apesar de Gazola *et al.* (2001) concluírem que as estirpes sensíveis aos fármacos têm uma maior infecciosidade que as estirpes resistentes, no nosso estudo a permissividade (75.00%) dos macrófagos peritoneais infectados e não tratados dos diferentes grupos não foi diferente da obtida num estudo prévio (71.33%) com a estirpe selvagem IMT373 (Maia *et al.*, 2007c).

O fenótipo de resistência desta estirpe foi determinado através do índice de inibição de crescimento (IC50) em função da sobrevivência dos parasitas após tratamento dos macrófagos com AMB. As células do grupo controlo foram as que necessitaram de uma menor dose de AMB para reduzir em 50% o número de parasitas viáveis enquanto que os macrófagos dos animais do grupo 373R160SG foram os que necessitaram de mais fármaco para reduzir para metade o número de amastigotas. Mbongo *et al.* (1998) também necessitou de mais fármaco para reduzir o número de parasitas resistentes à AMB no interior dos macrófagos peritoneais. De modo a verificar se o IC50 estava associado à produção de NO, a concentração de nitritos pelos macrófagos dos quatro grupos foi avaliada, tendo sido superior nas células tratadas com AMB. O grupo com menor IC50 foi o que produziu mais nitritos, demonstrando que as células sem contacto prévio com o parasita têm maior capacidade de activação das funções leishmanicidas, e deste modo, com uma maior capacidade de controlar a infecção. O aumento da produção de NO pelos macrófagos tratados com AMB já tinha sido observado por Sokol-Anderson *et al.* (1986) e

Mozaffarian *et al.* (1997) após infecção *in vitro* de macrófagos com *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente.

A diversidade das formas clínicas que a leishmaniose apresenta tem contribuído para o conceito de que o quadro clínico é consequência da resposta imunitária desenvolvida pelo hospedeiro (Farrell, 2002).

Os animais dos três grupos infectados estudados parecem ter desenvolvido nos diferentes órgãos uma resposta mista do tipo Th1/Treg, Th2/Treg ou Th1/Th2/Treg, com produção simultânea de citocinas associadas a ambos os tipos de resposta imune. O mesmo foi verificado por Rolão *et al.* (2007).

No presente estudo, o aumento de expressão das citocinas e iNOS esteve relacionado com o aumento da carga parasitária. Verificou-se uma correlação positiva entre a expressão de IL-4 e de IL-10, pelos hepatócitos dos grupos de mughanos co-inoculados com o extracto salivar, assim como, pelos esplenócitos do grupo 373WSG e as células medulares do grupo 373W.

A associação entre a expressão e produção destas duas citocinas tem vindo a ser descrita em vários trabalhos realizados em infecções experimentais no modelo murino, sendo ambas as citocinas sintetizadas pela subpopulação celular do tipo Th2 (Reed & Scott, 1993; Miralles *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 2002). Embora em infecções experimentais com *L. major* esteja bem documentado que a expansão da subpopulação Th2, com produção de IL-4 e IL-10, inibe uma resposta do tipo Th1, no presente estudo, observou-se uma correlação positiva entre a expressão de IL-4 e a de INF- γ no sangue dos grupos 373WSG e 373R160SG e nas células medulares do grupo 373W. A regressão dos sintomas na LV humana foi associada à presença de ambas as citocinas (Liew & O'Donnell, 1993). Nas células sanguíneas e hepáticas do grupo 373W também se detectou a associação entre IL-4 e TNF- α . Estas duas citocinas são cruciais na resolução local da infecção hepática ao promoverem a formação de granulomas: a TNF- α recruta leucócitos para o tecido hepático enquanto que a IL-4 é responsável pela activação das células T CD8+, as quais, por sua vez permitem a manutenção de uma protecção duradoura contra re-infecções (Stager *et al.*, 2003; Stanley & Engwerda, 2007).

A expressão de IL-10 e de INF- γ pelas células hepáticas dos grupos 373R160SG e 373W assim como pelas células medulares deste último, nos mesmos dias de colheita poderá ser explicada pelo efeito compensatório da IL-10 em relação à produção de INF- γ . De facto, a produção de citocinas do tipo Th1/Treg pode, por

vezes, estar associada não a funções efectoras, mas sim de regulação da resposta imune, como forma de limitar as consequências adversas da imunidade protectora mediada pelas células do tipo Th1 (Abbas *et al.*, 1996; Belkaid *et al.*, 2002).

Foi descrito que valores elevados de TNF- α no baço associados à indução da expressão de IL-10, contribuem para o estabelecimento e cronicidade da infecção (Stanley & Engwerda, 2007). A correlação negativa observada entre a expressão destas duas citocinas poderá ter sido a responsável pelo controlo e posterior eliminação dos parasitas pelos três grupos. Contudo, nas células do baço e fígado do grupo 373R160SG também se observou uma correlação negativa entre a expressão do TNF- α e a de TGF- β . Neste grupo, a expressão pelos esplenócitos desta citocina imunossupressora da resposta Th1 foi significativamente superior à dos grupos 373W e 373WSG, contribuindo, provavelmente, para que o baço deste grupo 373R160SG fosse o órgão mais parasitado.

Neste estudo observou-se ainda que, os valores mais elevados de carga parasitária nos órgãos dos diferentes grupos infectados ocorreram nos dias em que foram detectados os valores mais elevados de TGF- β . Esta associação, também observada em infecções por *L. infantum*/*L. chagasi* (Wilson *et al.*, 1998; Gantt *et al.*, 2003; Rolão, 2004) e *L. donovani* (Melby *et al.*, 2001), sugere o envolvimento desta citocina no favorecimento da capacidade de multiplicação do parasita, provavelmente através da inibição do desenvolvimento de uma resposta celular do tipo Th1.

Estudos experimentais de infecção por *L. donovani* e *L. infantum* no modelo murino têm demonstrado a coexistência de valores elevados de produção e expressão de IFN- γ com elevado parasitismo (Miralles *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1996; Rousseau *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2003; Rolão, 2004). No entanto, no nosso estudo o IFN- γ foi, com excepção nas células da medula do grupo 373WSG, mais expresso na ausência do parasita. As reduções observadas na carga parasitária dos animais deste estudo poderão ser explicadas então, pelo aumento do IFN- γ , que é conhecido como um dos principais activadores dos macrófagos para a destruição dos parasitas através da activação da iNOS e consequente produção de óxido nítrico (Farrell, 2002). Este resultado está mais de acordo com o observado em infecções experimentais com espécies dermatrópicas, onde tem sido descrito que, em estirpes de ratinhos resistentes à infecção, a valores elevados de IFN- γ correspondem níveis reduzidos de parasitas (Rogers *et al.*, 2002). A expressão de iNOS pelos esplenócitos foi maior nos dias em que se amplificou DNA de *Leishmania* a partir das amostras de

baço dos diferentes grupos, não sendo expressa a partir do D84. O aumento da expressão de iNOS no gânglio e no baço em resposta à infecção por *L. donovani* também ocorreu no estudo realizado por Melby *et al.* (1998). Zafra *et al.* (2008) observaram que o aumento da expressão de iNOS pelos macrófagos caninos se encontrava associado a um menor número de amastigotas no interior das células e a um controlo da disseminação da infecção.

Carvalho *et al.* (1992) associaram a presença de IFN- γ no sangue de crianças infectadas com *L. chagasi*/*L. infantum* como marcador de doença activa. No nosso estudo, o IFN- γ foi expresso do sangue dos animais dos diferentes grupos apenas nos dias em que se detectou DNA parasitário. Considerando os resultados do modelo murino e o que ocorreu na leishmaniose humana, pode-se concluir que a determinação da expressão de IFN- γ neste tecido pode ser utilizada como valor prognóstico da evolução da infecção.

Ao longo da maior parte do período experimental verificou-se que a expressão de citocinas pelos diferentes órgãos nos três grupos de murganhos infectados sugere o desenvolvimento de respostas celulares mistas Th1/Th2/Treg, tal como observado por outros autores (Melby *et al.*, 1998; Stanley & Engwerda, 2007; Rolão *et al.*, 2007). Tendo em conta que a resposta imunitária foi focalizada para cada órgão e diferente entre os órgãos, pode-se concluir que a avaliação de uma resposta à infecção por *L. infantum* deve ser determinada nos diferentes locais. A partir do D84 não se detectaram parasitas em nenhum dos três grupos infectados. Tendo em conta que o TNF- α é conhecido como um dos principais activadores dos macrófagos na destruição dos parasitas através da activação da iNOS e consequente produção de óxido nítrico (Farrell, 2002), o controlo da infecção nos diferentes tecidos poderá ser explicado pela presença do TNF- α , que foi a citocina mais expressa em todos os órgãos nesse dia.

CAPÍTULO IV

ESTUDO COMPORTAMENTAL DA ESTIRPE DE *L. infantum* TRATADA COM ANFOTERICINA B NOS VECTORES

Phlebotomus perniciosus* E *Lutzomyia longipalpis

4. Estudo comportamental da estirpe de *L. infantum* tratada com anfotericina B nos vectores *P. perniciosus* e *Lutzomyia longipalpis*

O vector de *L. infantum* (*L. chagasi* no Novo Mundo é *Lutzomyia longipalpis* enquanto que no Velho Mundo várias espécies de flebótomos do subgénero Larroussious, tal como *Phlebotomus perniciosus*, são responsáveis pela sua transmissão (Killick-Kendrick, 1999).

4.1. Material e Métodos

Este estudo foi realizado durante um estágio no Laboratório de Parasitologia da Faculty of Science, Charles University, Praga, República Checa sob orientação do Prof. Petr Volf e com a colaboração da Doutora Jovana Sadlová e da doutoranda Lucie Jecna.

As infecções experimentais foram repetidas duas vezes.

4.1.1. Preparação da membrana de pinto para alimentação artificial de fêmeas de flebótomos

4.1.1.1. Animais

Foram utilizados pintos (*Gallus gallus domesticus*) com 1 a 3 dias de idade. Após remoção das penas, a pele ventral foi desbridada e em seguida repetiu-se o processo na pele dorsal. A pele foi então colocada numa placa de Petri e lavada três vezes: a primeira com etanol a 70%, a segunda com etanol absoluto e a última lavagem com H₂O destilada autoclavada. Cada lavagem teve a duração de 10 minutos.

4.1.2. Infecção de flebótomos com promastigotas de *L. infantum* tratados ou não com anfotericina B

4.1.2.1. Parasitas

Os parasitas utilizados para a infecção dos flebótomos foram os descritos em 2.2: promastigotas da estirpe selvagem (373W) e promastigotas tratados com 160 ng/ml de anfotericina B (373R160).

Para a alimentação artificial dos flebotomíneos foram utilizados promastigotas no 4º dia da fase logarítmica de crescimento a uma concentração de 10^7 parasitas/ml. O sedimento foi ressuspensionado em soro fisiológico após ter sido lavado três vezes para remoção dos antibióticos existentes no meio de cultura.

4.1.2.2. Flebótomos

As colónias de *Phlebotomus perniciosus* e de *Lutzomyia longipalpis* foram mantidas no insectário do laboratório de Parasitologia.

Foram utilizadas 400 fêmeas de flebótomo no total, 100 de cada espécie por fenótipo de *L. infantum*. No dia anterior à alimentação artificial os algodões embebidos numa solução a 50% de sacarose e mel, suplementados com penicilina, foram removidos.

4.1.2.3. Infecção dos flebótomos por alimentação artificial

A alimentação foi realizada segundo descrito por Tesh & Modi (1984). Resumidamente, a membrana de pinto foi colocada na base do alimentador de vidro. Após verificar a inexistência de orifícios, adicionaram-se os promastigotas diluídos em 4 ml de sangue de coelho desfibrinado, previamente inactivado a $+56^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. De seguida o alimentador foi preso ao suporte e ligado à circulação externa do banho Maria. Após verificar que o fluxo e o aquecimento do sangue a $+37^{\circ}\text{C}$ se fazia sem interrupções, o alimentador foi colocado no interior da gaiola com os flebotomíneos. Permitiu-se que as fêmeas se alimentassem durante 1 hora.

Após alimentação voltou-se a colocar algodões embebidos em sacarose ou em mel, suplementados com penicilina, na gaiola para as fêmeas que não se alimentaram e para os machos.

4.1.3. Determinação da percentagem e intensidade da infecção

De modo a determinar a percentagem de infecção, dois dias após a refeição artificial, procedeu-se à disseção de várias fêmeas em tampão PBS. O aparelho digestivo foi removido e a membrana peritrófica perfurada para observação ao microscópio óptico da presença e localização dos parasitas. A intensidade da infecção foi determinada seguindo os critérios descritos por Cihakova & Volf (1997): infecção ligeira (<100 parasitas/intestino); moderada (100-500); intensa (500-1000) e muito intensa (>1000).

Dez dias após a refeição artificial procedeu-se à disseção* de todas as fêmeas sobreviventes de modo a determinar a taxa de infecção após digestão da refeição sanguínea. O aparelho digestivo foi removido e observado ao microscópio óptico para determinar a intensidade da infecção assim como a localização dos parasitas.

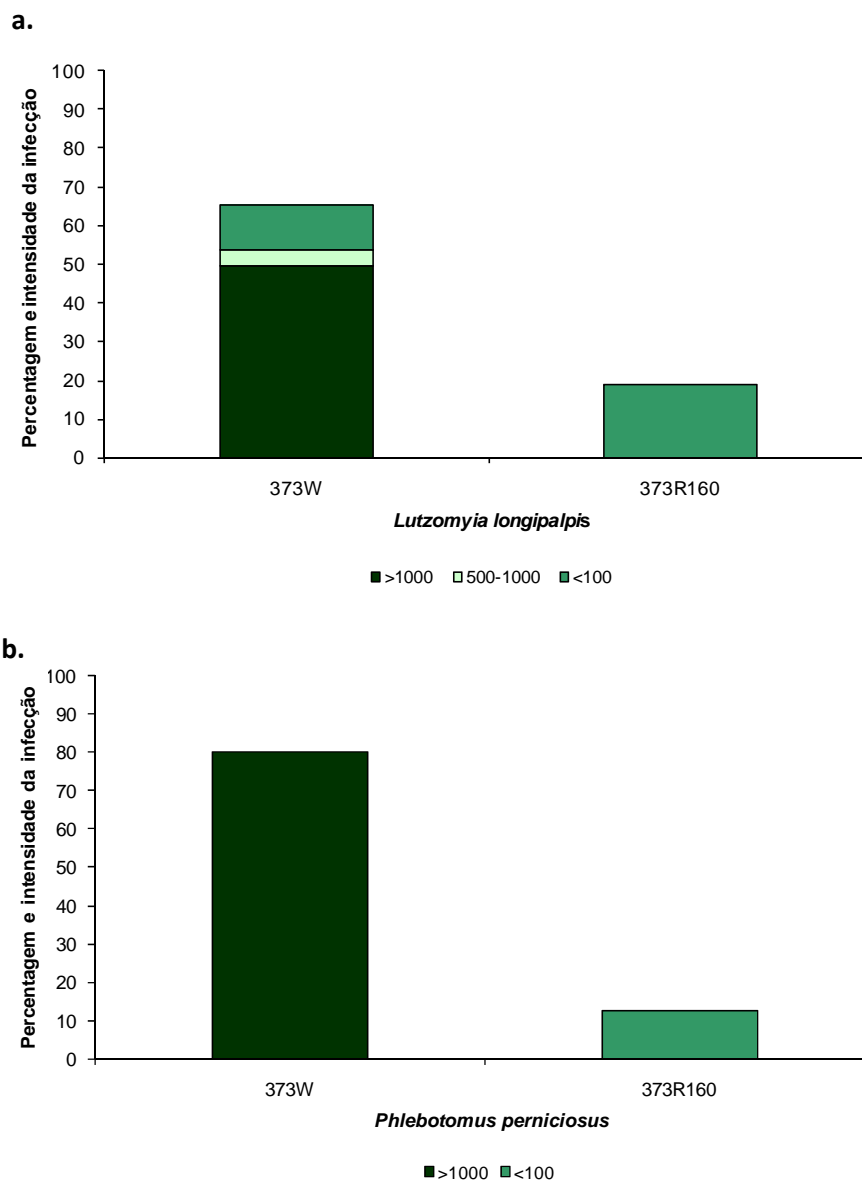
Consideraram-se infectantes as fêmeas em que houve colonização da válvula estemodal pelos promastigotas, isto é, quando foram observadas formas haptomonas aderentes entre si e à cutícula da válvula assim como promastigotas metacíclicos posicionados nessa região.

4.2. Resultados

4.2.1. Percentagem e intensidade da infecção dois dias após refeição artificial

Dois dias após a refeição artificial, procedeu-se à disseção de várias fêmeas. As fêmeas de *P. perniciosus* e *L. longipalpis* alimentadas com a estirpe selvagem de *L. infantum* IMT373 (373W) apresentaram uma percentagem de infecção de 80.0% e 65.38%, enquanto que o número de exemplares infectados com a estirpe tratada com 160 ng/ml de anfotericina B (373R160) foi de 12.5% e 19.23%, respectivamente (Figura 4.1).

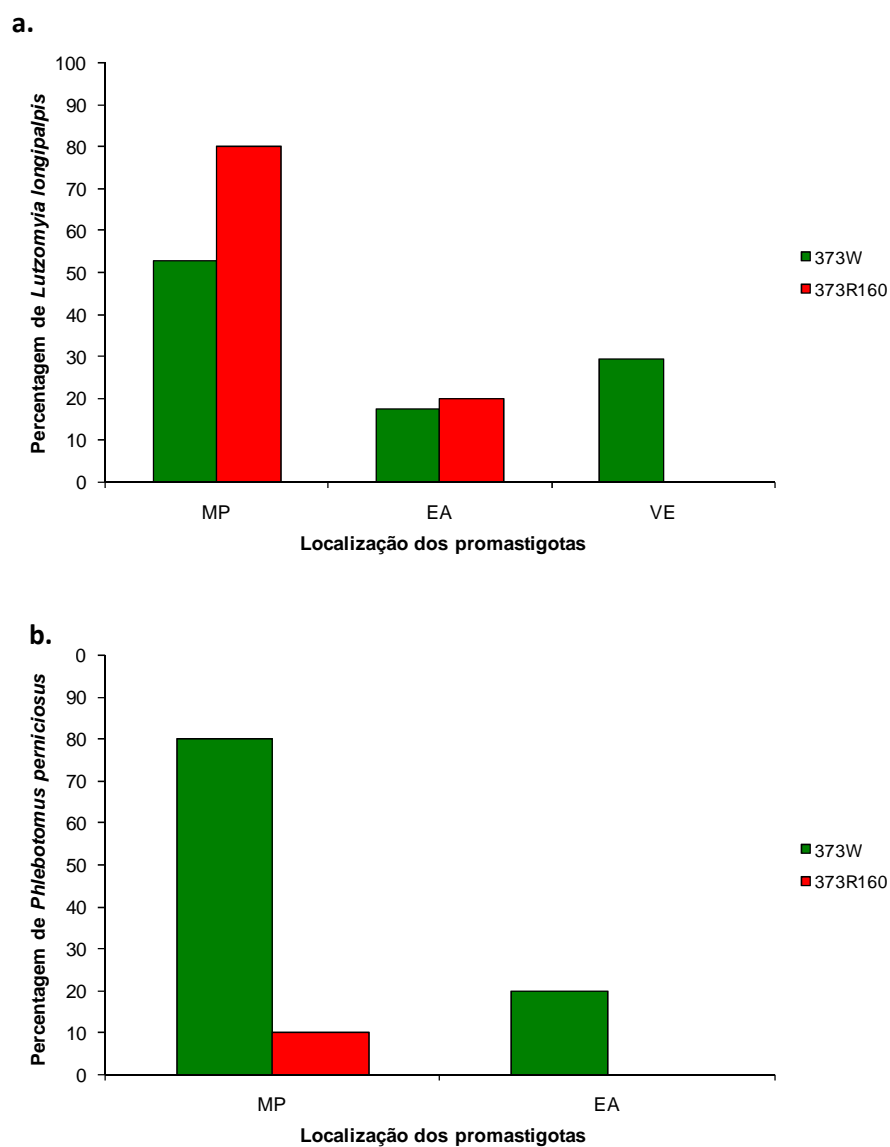
Figura 4.1. Percentagem e intensidade da infecção dois dias após a refeição sanguínea de fêmeas *Lutzomyia longipalpis* (a.) e *Phlebotomus perniciosus* (b.) alimentadas com a estirpe selvagem de *Leishmania infantum* IMT373 (373W) e com a estirpe tratada com 160 ng/ml de anfotericina B (373R160).



Todas as fêmeas de *P. perniciosus* e 76.47% dos exemplares de *L. longipalpis* infectadas com a estirpe 373W e apresentavam mais de 1000 parasitas no seu estômago, enquanto que a intensidade de infecção com a estirpe 373R160 foi menor (< 100 parasitas) para ambas as espécies de flebótomos.

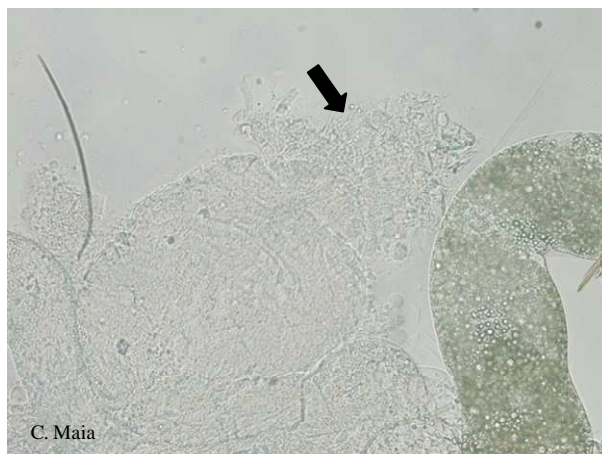
Dois dias após infecção a maioria das formas promastigotas de ambos os fenótipos de *Leishmania* localizavam-se, nos vectores, no interior da membrana peritrófica (Figura 4.2). Contudo, no caso da *L. longipalpis*, 29.41% dos parasitas da estirpe 373W já se encontravam na válvula estemodeal (Figura 4.3).

Figura 4.2. Localização dos promastigotas da estirpe selvagem de *Leishmania infantum* IMT373 (373W) e da estirpe tratada com 160 ng/ml de anfotericina B (373R160) no interior das fêmeas *Lutzomyia longipalpis* (a.) e *Phlebotomus perniciosus* (b.) dois dias após a refeição sanguínea.



MP: Membrana peritrófica; EA: Estômago abdominal; VE: Válvula estemodeal

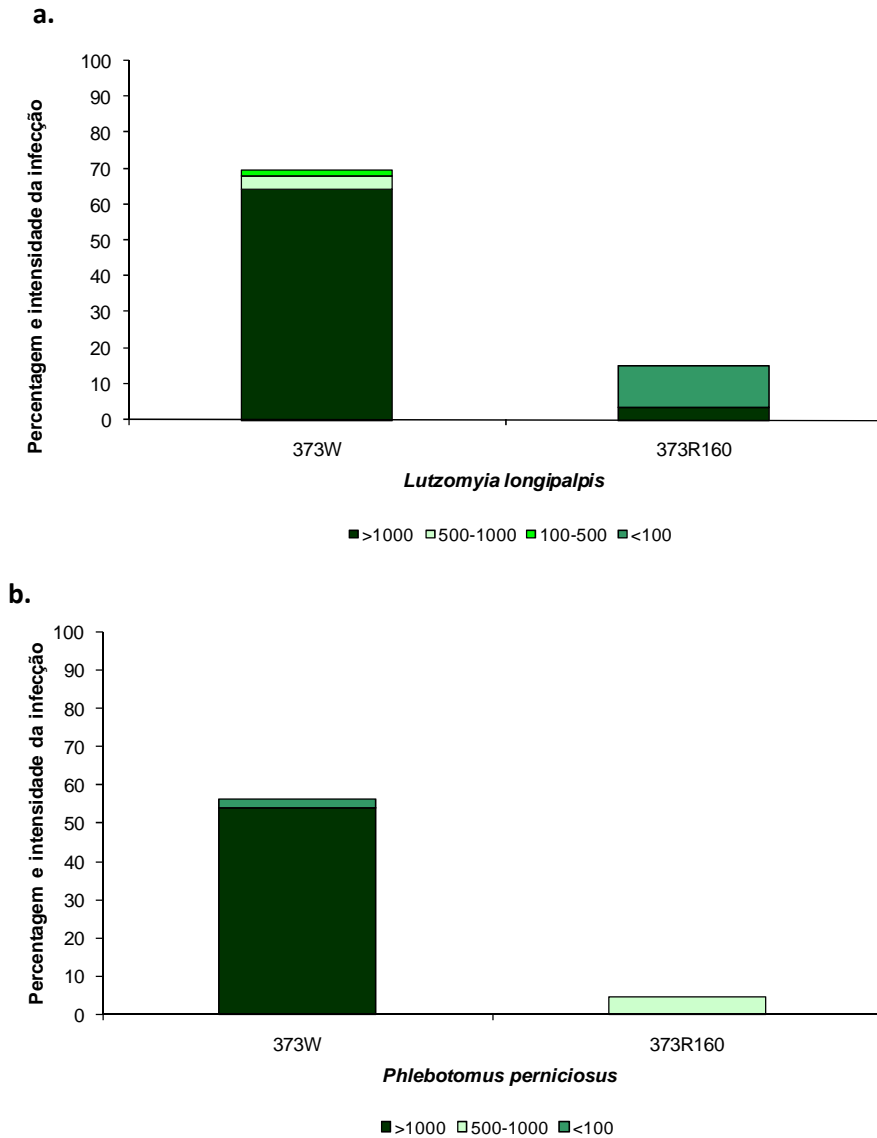
Figura 4.3. Formas promastigotas de *Leishmania infantum* 373W na válvula estemodeal de *Lutzomyia longipalpis* dois dias após alimentação artificial.



4.2.2. Percentagem e intensidade da infecção dez após refeição artificial

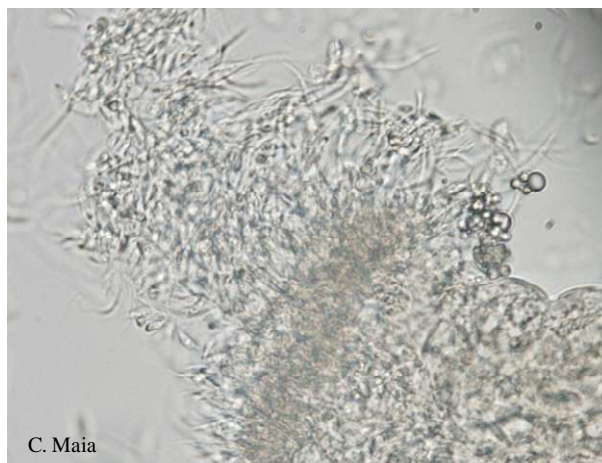
Dez dias após a refeição sanguínea, mais de metade das fêmeas de *L. longipalpis* (69.81%) e de *P. perniciosus* (56.1%) encontravam-se infectadas com a estirpe 373W; a intensidade da infecção foi novamente muito elevada para as espécies de flebótomos do Novo e do Velho Mundo, 91.90 e 95.65%, respectivamente (Figura 4.4). Ambas as espécies vectoras se encontravam pouco infectadas com a estirpe 373R160. Apesar da baixa percentagem de infecção (15.25% *L. longipalpis*, 4.55% *P. perniciosus*), 22.22% das fêmeas *L. longipalpis* infectadas apresentaram mais de 1000 parasitas e 77.78% das fêmeas apresentavam menos de 100 promastigotas no seu estômago, enquanto que os exemplares de *P. perniciosus* apresentaram intensidade elevada (55,66%).

Figura 4.4. Percentagem e intensidade da infecção dez dias após a refeição sanguínea de fêmeas *Lutzomyia longipalpis* (a.) e *Phlebotomus perniciosus* (b.) alimentadas com a estirpe selvagem de *Leishmania infantum* IMT373 (373W) e com a estirpe tratada com 160 ng/ml de anfotericina B (373R160).



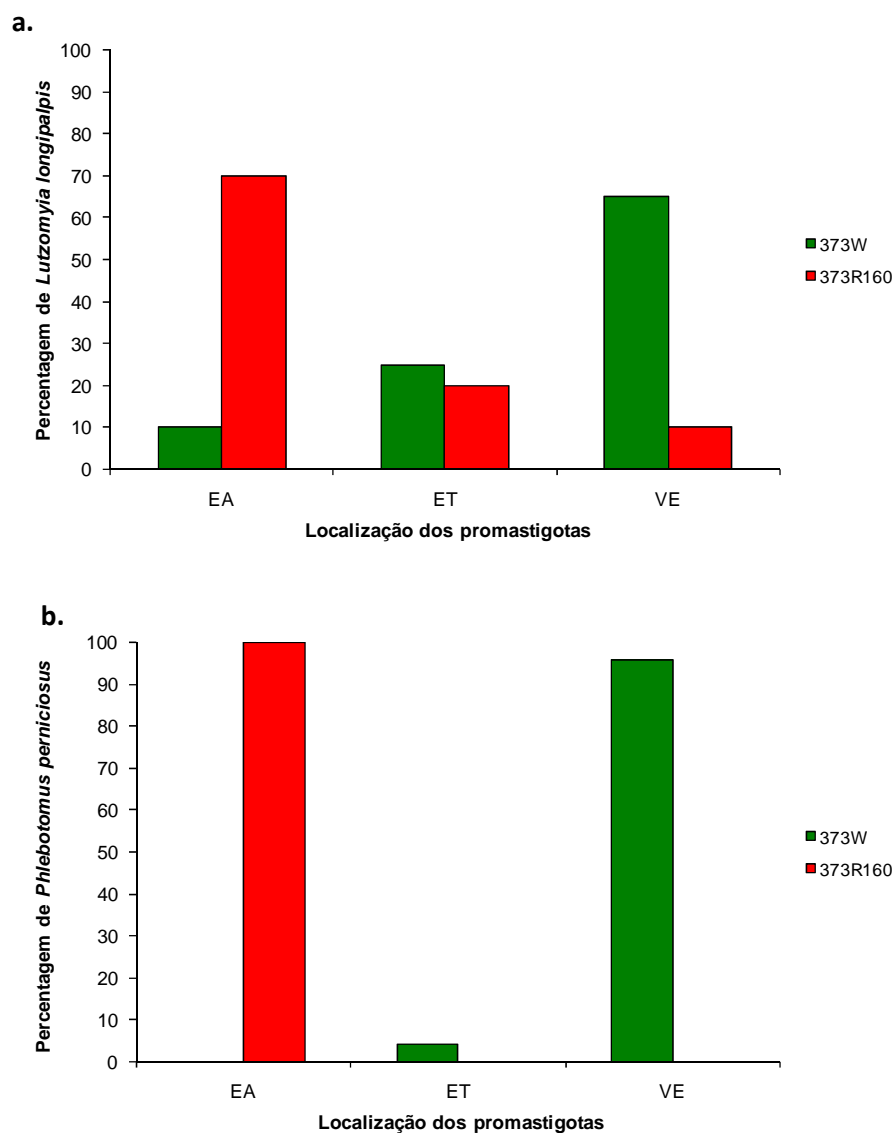
No final da experiência, a localização das formas parasitárias nas duas espécies flebotomíneas não foi totalmente concordante. Nas fêmeas *P. perniciosus* infectadas com a estirpe 373W, a maior parte dos parasitas de estirpe 373W localizava-se na válvula estomodeal (95.65%) com 73.91% de colonização (Figura 4.5), enquanto que no caso de *L. longipalpis* 35.0% dos promastigotas encontravam-se nos estômagos torácico e abdominal e a colonização da válvula estomodeal foi de 51.35%.

Figura 4.5. Formas promastigotas de *L. infantum* 373W na válvula estemodeal de *Lutzomyia longipalpis* dez dias após alimentação artificial.



Nas fêmeas *P. perniciosus* infectadas com a estirpe 373R160, apenas foram encontrados parasitas no estômago abdominal. Esta localização também foi a observada em 70.0% dos exemplares *L. longipalpis*. Apesar de 10.0% dos promastigotas se localizarem na válvula estemodeal, não se observou colonização em nenhuma das fêmeas (Figura 4.6).

Figura 4.6. Localização dos promastigotas da estirpe selvagem de *L. infantum* IMT373 (373W) e da estirpe tratada com 160 ng/ml de anfotericina B (373R160) no interior das fêmeas *Lutzomyia longipalpis* (a.) e *Phlebotomus perniciosus* (b.) dez dias após a refeição sanguínea.



EA: Estômago abdominal; ET: Estômago torácico; VE: Válvula estemodeal

4.3. Discussão

Após se verificar que a estirpe de *L. infantum* tratada com AMB tinha a capacidade de infectar e visceralizar no modelo murino, o seu comportamento em dois dos principais vectores de *L. infantum*, *L. longipalpis* e *P. perniciosus*, foi analisado.

Apesar de ambas estirpes, selvagem IMT373 (373W) e tratada com 160ng/ml de anfotericina B (373R160), se terem desenvolvido nos vectores, os seus comportamentos foram diferentes. As diferenças observadas entre o comportamento das duas estirpes de *Leishmania* não foram resultantes de variáveis externas ao estudo tais como idade das fêmeas, lote de sangue, período de alimentação, condições de manutenção das colónias, uma vez que ambas as experiências foram feitas em paralelo.

As fêmeas *L. longipalpis* e *P. perniciosus* apresentaram antes e após digestão da refeição sanguínea, uma elevada percentagem de infecção com a estirpe 373W (56.1 a 80.0%) assim como uma elevada intensidade de infecção (parasitas >1000) por exemplar. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outros estudos (Pozio *et al.*, 1985; Volf *et al.*, 2007). Um dos factores que determinam se uma espécie de flebótomo é vector de *Leishmania*, é a persistência de promastigotas no seu interior, após a digestão da refeição sanguínea (Sacks & Kamhawi, 2001). Neste estudo, os parasitas permaneceram após a digestão e a colonização da válvula estemodeal ocorreu na maior parte das fêmeas infectadas, confirmando que estas duas espécies de flebótomos são vectores competentes de *L. infantum* (Killicki-Kendrick, 1999).

Embora Al-Mohammed *et al.* (2005) sugiram que as alterações fenotípicas e bioquímicas observadas nos promastigotas resistentes (tratados com Anfotericina B) à AMB impedem a infecção dos flebótomos e o subsequente desenvolvimento dos parasitas no seu interior, no nosso estudo, ambos vectores ficaram infectados com a estirpe tratada com AMB, apesar da percentagem e intensidade da infecção terem sido inferiores (4.55 a 19.23%) ao que aconteceu com a estirpe não tratada. A baixa percentagem e intensidade de infecção verificadas podem dever-se a alterações da composição química dos esteróis da membrana nos parasitas resistentes à AMB, as quais inibem algumas funções dos seus receptores. Estas alterações membranares podem ser responsáveis por uma maior susceptibilidade à acção das enzimas

proteolíticas do aparelho digestivo dos flebótomos (Sacks & Kamhawi, 2001), por uma menor capacidade de evasão através da membrana peritrófica, como consequência de uma deficiente produção da enzima quitinase (Schlein *et al.*, 1991), assim como pela diminuição ou impedimento de ligação dos parasitas aos receptores intestinais do vector (Pimenta *et al.*, 1992).

Embora no décimo dia de experimentação, 15.25% das fêmeas de *L. longipalpis* se encontrassem infectadas, a maior parte dos parasitas situava-se no estômago abdominal. O facto de nenhuma das fêmeas apresentar colonização da válvula estemodeal, apesar de 10% apresentar promastigotas nessa região, dever-se-à provavelmente a um desenvolvimento mais lento dos parasitas no interior do vector, tal como observado *in vitro* por Mbongo *et al.* (1998) com os promastigotas de *L. donovani* resistentes à AMB.

Apesar de não se terem realizado ensaios de transmissão, a migração dos promastigotas para a válvula estemodeal sugere que a sua transmissão durante a picada do vector pode ocorrer na Natureza (Tesh & Modi, 1984). De modo a verificar se os promastigotas, tratados com AMB, presentes na válvula estemodeal teriam capacidade de a colonizar, em estudos futuros dever-se-ia proporcionar o desenvolvimento dos parasitas no interior das fêmeas após a refeição artificial, durante um período de tempo mais longo.

Por último, a menor capacidade dos parasitas tratados com AMB permanecerem no interior do vector assim como o seu desenvolvimento mais lento apontam para uma menor capacidade de estirpes resistentes a este fármaco serem transmitidas na Natureza, pelo que o tratamento dos parasitas com AMB poderá ser favorável à prevenção e controlo através do bloqueio do ciclo de vida do parasita.

CAPÍTULO V

ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Leishmania* A FÁRMACOS

5. Estudos de susceptibilidade de *Leishmania* a fármacos

Como a farmacoterapêutica das leishmanioses humana e canina utiliza os mesmos agentes, a exposição do parasita ao fármaco pode ser muito prolongada devido ao tratamento do reservatório animal, podendo promover assim a selecção de mutantes resistentes.

A inexistência de uma terapia eficaz é particularmente acentuada nos cães e nos doentes co-infectados com *Leishmania*/HIV, constituindo estes dois grupos o reservatório dos parasitas responsáveis pela leishmaniose humana zoonótica. Em Portugal, nos últimos anos, tem vindo a aumentar a prevalência da leishmaniose canina a qual se encontra disseminada por todo o país, também novos casos de co-infecção continuam a verificar-se pelo que se torna premente um conhecimento aprofundado dos mecanismos da falência do tratamento.

A monitorização da resistência aos fármacos requer metodologias capazes de determinar a sensibilidade dos isolados do parasita assim como os marcadores moleculares que indicam as alterações no alvo do fármaco ou os mecanismos que alteram a concentração do mesmo no interior do parasita (Croft, 2001).

5.1. Material e Métodos

5.1.1. Fármacos utilizados

Glucantime® - antimonio-N-metil-glutamina, Rhône Mérieux, Portugal

Fungizone® - anfotericina B, Briston Myers Squibb, Portugal

Miltefosine – hexadecifosfocolina, Zentaris, Alemanha

Alopurinol - pirazolopirimidina, Atral-Cipan, Portugal

5.1.2. Estirpes de *Leishmania* utilizadas

As estirpes caninas utilizadas neste estudo foram obtidas por método activo em clínicas veterinárias e canis municipais da região de Lisboa. A obtenção de estirpes humanas foi por método passivo, tendo sido recebidas as amostras clínicas para a Unidade de Leishmanioses pelos Hospitais para identificação do parasita. Todas as estirpes utilizadas (Quadro 5.1) foram isoladas de formas clínicas viscerais.

Quadro 5.1. Caracterização das estirpes de *Leishmania* utilizadas no estudo.

Estirpe	Proveniência	Espécie de <i>Leishmania</i>	Observações
MCAN/PT/05/IMT-373	Canídeo	<i>L. infantum</i> MON-1	Sem tratamento
MCAN/PT/04/IMT-352	Canídeo	<i>L. infantum</i> MON-1	Após tratamento com alopurinol levamisol
MHOM/PT/88/IMT-151	Humano imunocompetente	<i>L. infantum</i> MON-1	Sem tratamento
MHOM/PT/93/IMT-184	Humano imunodeprimido	<i>L. infantum</i> MON-1	Sem tratamento
MHOM/PT/94/IMT-211	Humano imunodeprimido	<i>L. major</i> + <i>L. infantum</i>	Após tratamento com Fungizone® e Glucantime®
MHOM/PT/05/IMT-369	Humano imunocompetente	<i>L. infantum</i> MON-1	Após falha terapêutica com Glucantime®

O objectivo deste estudo foi desenvolver um modelo *in vitro* para o estudo da susceptibilidade de *L. infantum* aos fármacos utilizados actualmente na terapêutica da leishmaniose visceral em Portugal.

5.1.3. Optimização do sistema de promastigotas axénicos

Os promastigotas da estirpe IMT151 foram obtidos como descrito em 2.2.1.2. Os parasitas com mais de cinco subculturas *in vitro*, foram recolhidos na fase estacionária da curva de crescimento, de forma a obter o número máximo de promastigotas. A contagem de parasitas por microscopia óptica foi efectuada em câmara de Neubauer.

Para optimização deste sistema foram testadas diversas técnicas utilizando diferentes concentrações dos fármacos, de parasitas, bem como diferentes tempos de incubação.

5.1.3.1. Contagem por microscopia óptica do número de promastigotas viáveis

Foram colocados em microplacas de 96 poços, fundo em U, 100 µl/poço de promastigotas, aos quais foram adicionados 100 µl/poço de fármaco, em diluições seriadas de 1:2. De seguida, as placas foram incubadas a +26°C durante 48 horas.

5.1.3.2. Actividade da fosfatase ácida

Esta técnica consiste na quantificação da fosfatase ácida libertada para o sobrenadante após lise da membrana plasmática das parasitas viáveis (Bodley *et al.*, 1995; Carrió *et al.*, 2000).

Os promastigotas foram colocados nas condições referidas em 5.2.3.1.1.2. Após as 48 horas de incubação, removeram-se 40 µl de cada poço para uma nova microplaca de 96 poços, fundo plano, e adicionaram-se 100 µl/poço de tampão citrato de sódio (90mM, Sigma) com 1% de triton-100X, pH 4,8 de modo a lisar as células e

100 µl/poço de p-nitrofenil fosfatase (10 mM, Sigma). Estas placas foram, posteriormente, incubadas a +37°C num ambiente húmido durante 2 horas.

Para o bloqueio da reacção enzimática adicionou-se 60 µl/poço de NaOH 1M e determinou-se a absorvância em 405 nm em espectrofotómetro.

5.1.3.3. Actividade da lactato desidrogenase (“Cytotoxicity Detection Kit plus”, Roche Diagnostics GmbH)

Esta técnica consiste na quantificação do LDH libertado para o sobrenadante após ruptura da membrana plasmática das células metabolicamente activas (viáveis).

Foram colocados em microplacas de 96 poços, fundo plano, 50 µl/poço de promastigotas, aos quais foram adicionados 50 µl/poço de fármaco, em diluições seriadas de 1:2. Em seguida, foi a incubar a +26°C durante 24 horas. Após incubação adicionaram-se 100µl da mistura de reacção (mistura de NAD⁺ e diaforase com cloreto de iodotetrazolium e lactato de sódio) por poço e incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente, protegendo a placa da luz com papel de prata. Para o bloqueio da reacção enzimática adicionaram-se 50 µl/poço da solução bloqueadora do teste rápido e agitou-se a placa durante 10 segundos. A absorvância foi determinada em 492 nm em espectrofotómetro.

5.1.3.4. XTT (“Cell proliferation Kit II”, Roche Diagnostics GmbH)

Esta técnica consiste na ruptura da molécula do sal de tetrazolium amarelo pelas desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente activas (viáveis) formando um produto alaranjado que é directamente quantificável.

Os promastigotas foram colocados nas condições referidas em 5.2.3.1.1.4. De seguida, as placas foram incubadas a +26°C durante 48 horas. Após a incubação adicionou-se 50 µl/poço da mistura de XTT (49µl XTT + 1µl “electron coupling reagent”) e incubou-se a placa a 37°C durante 6h. A absorvância foi lida de 2 em 2 horas no comprimento de onda de 450 nm.

5.1.3.5. Actividade do PicoGreen®

O Picogreen® (Invitrogen) é um fluorocromo ultrasensível que se intercala nas cadeias duplas de DNA (dsDNA). A fluorescência deste composto quando ligado às dsDNA é mais de 1000 vezes superior do que quando em solução. O método

possibilita a detecção de quantidades tão baixas como 25 pg/mL em espectrofluorometria (Singer *et al.*, 1997; Corbett *et al.*, 2004).

Colocaram-se 100 µl/poço de parasitas, em microplacas de 96 poços, fundo em U, aos quais foram adicionados 125 µl/poço de fármaco, em concentrações seriadas de 1/5. Seguidamente, as placas foram incubadas a +26 °C durante 48 horas. Após a incubação centrifugou-se a 925 g durante 10 minutos. Rejeitaram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 200 µl/poço de corante Picogreen® diluído em TE [1,5ml TE: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) + 7,5 µl picogreen)]. A fluorescência foi, então, lida no equipamento Turner biosystems (TBS-380).

5.1.4. Determinação da susceptibilidade *in vitro* dos promastigotas axénicos aos fármacos em estudo

Depois de analisar os resultados obtidos com as técnicas referidas anteriormente, optou-se por utilizar a técnica de XTT para testar *in vitro* a susceptibilidade dos promastigotas axénicos aos fármacos em estudo. Assim, para avaliar a resposta aos fármacos, 2×10^7 /ml promastigotas na fase estacionária, cultivados em microplacas de 96 poços, fundo plano, foram incubados com diferentes concentrações dos compostos em estudo (Quadro 5.2) a +26°C durante 48 horas.

Quadro 5.2. Concentrações dos fármacos usadas nos ensaios de susceptibilidade de promastigotas axénicos de *Leishmania*.

Fármaco	Concentrações							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Glucantime® (mg/ml)	300	75	18.75	4.6875	1.1718	0.2929	0.0732	0
Fungizone® (µg/ml)	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0
Miltefosine (µg/ml)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0
Alopurinol (µg/ml)	5000	1250	312.5	78.125	19.531	4.883	1.221	0

O fenótipo de resistência das estirpes de *L. infantum* em estudo foi determinado em função da sobrevivência dos parasitas após tratamento com o fármaco através do índice de inibição de crescimento (IC50), o qual corresponde à concentração de fármaco necessária para reduzir em 50% o número de parasitas viáveis em relação à cultura de parasitas selvagens, i.e., sem adição de fármaco (H).

Para cada estirpe analisada realizaram-se dois ensaios com cada fármaco em triplicado.

5.1.5. Optimização do sistema amastigota-macrófago

Neste estudo usaram-se murganhos de ambos os sexos da estirpe BALB/c com mais de 6 semanas de idade adquiridos no Biotério do IHMT. Os animais foram mantidos como descrito em 2.1.

Para a infecção *in vitro* dos macrófagos utilizaram-se duas estirpes de *L. infantum*: MHOM/PT/88/IMT151 (IMT151) e MCAN/PT/05/IMT373 (IMT373). Os parasitas, mantidos como descrito em 1.2., foram recolhidos na fase estacionária de crescimento.

5.1.5.1. Selecção do sistema de macrófagos

5.1.5.1.1. Diferenciação de monócitos em macrófagos a partir do sangue periférico canino e humano

Para obtenção de macrófagos, procedeu-se à diferenciação dos monócitos a partir do sangue periférico de cão e humano saudáveis, como descrito em 2.1.9.1.

Colocaram-se, em placas de 8 poços LabTek, 300 µl de suspensão celular (5×10^6 /ml) por poço. Incubou-se a $+37^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 durante seis dias de modo a que ocorresse a diferenciação dos macrófagos.

5.1.5.1.2. Diferenciação de monócitos em macrófagos a partir de células precursoras da medula óssea de murganhos (BMDM)

Para obtenção de uma população de macrófagos homogénea e com um número elevado de células, a partir de células precursoras da medula óssea, utilizou-se a técnica descrita por Antoine *et al.* (1991). Este método utiliza o factor estimulador de colónias (CSF) para diferenciação dos macrófagos de acordo com o descrito por Stanley & Heard (1977).

Após sacrifício dos murganhos, a medula óssea foi extraída por lavagens sucessivas do fémur e da tíbia com uma agulha de 25G montada em seringa com solução de HBSS, a suspensão celular foi homogeneizada e a lise dos glóbulos vermelhos efectuada pela adição da solução de lise de Gey (cloreto de amónia 1.5 M, EDTA 0.1 mM, pH 7.3) (Mishell & Shigi, 1980), numa proporção de 5 ml de solução de lise para 2 ml de suspensão celular, seguida de incubação a $+4^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Foi efectuada centrifugação a 370 g, durante 5 minutos a $+4^\circ\text{C}$ e o sedimento ressuspenso em meio RPMI/FCS 10%. A concentração celular foi ajustada para 1.5×10^6 células/ml. A esta suspensão celular foi adicionado CSF de

modo a obter uma concentração final de 10% (v/v). Nesta concentração o CSF é indutor da divisão celular e da diferenciação de monócitos. A suspensão celular da medula óssea foi incubada em placa de Petri hidrofílica (Nunc) a +37°C, 5% CO₂ em atmosfera húmida. Ao terceiro dia de cultura foi adicionado meio RPMI/FCS 10%, CSF 10%. Após cinco dias de incubação, o sobrenadante foi recolhido de modo a recuperar as células semi-aderentes e em suspensão resultantes de divisão celular induzida pelo CSF. A suspensão celular foi centrifugada a 370 g, durante 10 minutos a +4°C, e o sedimento ressuspensionado em RPMI/FCS 10% CSF 1/40 (v/v). Nesta concentração o CSF é indutor da maturação dos monócitos em macrófagos, apresentando actividade subproliferativa. Para desagrupar as células que sofreram divisão, a suspensão celular foi passada por agulhas de diâmetro progressivamente menor (25G, 27G e 30G). A concentração celular foi ajustada para 5×10^5 células/ml após contagem em hemacitómetro tendo sido colocados 300 µl/poço de suspensão celular em placas de 8 poços. Incubou-se durante 24 horas a +37°C, 5% CO₂ em atmosfera húmida, para promover a aderência das células.

5.1.5.1.3. Macrófagos peritoneais derivados de murganhos

Para obtenção de macrófagos peritoneais, cada murganho foi inoculado com 3 ml de tiogliconato de sódio (Sigma) a 3%, por via i.p., de modo a provocar uma infecção e deste modo haver uma chamada de macrófagos ao local de inoculação. 72 horas após a administração do tioglicolato, inocularam-se por via i.p. 5 ml de PBS 1X a +4°C e massajou-se a região abdominal durante 5 minutos de modo a provocar vasoconstrição e acumulação celular. Após o sacrifício dos animais, abriu-se a cavidade abdominal para recolha do exsudado peritoneal. As células recolhidas foram centrifugadas e ressuspensionadas em RPMI/FCS 10%. De seguida, colocou-se 300 µl de suspensão celular (5×10^5 /ml) em placas de 8 poços Lab Tek e incubou-se a +37°C, 5% de CO₂, durante 24h.

5.1.5.1.4. Diferenciação das células da linha monocitária U-937 em macrófagos

A linha celular humana U937 (Human lymphoma histiocytic cell line, ATCC nº CRL1593) (Ogunkolade *et al.*, 1990) foi mantida em fase logarítmica de crescimento em meio RPMI/FCS 10% a 37°C, 5% de CO₂.

Para estimular a sua diferenciação em macrófagos, os monócitos desta linha celular foram incubados em meio RPMI/FCS 10% suplementado com diferentes concentrações de:

a) Ácido retinóico. Numa placa de cultura celular de 8 poços Lab Tek colocaram-se 300 µl da suspensão celular (1×10^6 /ml) com 1, 2, 4, 8 µM de ácido retinóico (Sigma) por poço. A estimulação das células foi efectuada em triplicado para cada concentração de ácido retinóico e incubadas a +37°C, 5% de CO₂ durante três dias. Após este período, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa.

b) PMA (“Phorbol myristate acetate”, Sigma). Os monócitos foram incubados nas mesmas condições referidas para o ácido retinóico, mas utilizando o PMA como factor de diferenciação nas concentrações de 12.5, 25, 50, 100 ng/ml. Após dois dias de incubação, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa.

5.1.5.1.5. Macrófagos derivados da linha canina histiocitária DH82

A linha canina histiocitária DH82 ((Dog monocyte-macrophage cell line, ECACC nº 94062922) é uma linha aderente que tem a vantagem de ser macrofágica, não necessitando, assim, de ser diferenciada artificialmente (Wellman *et al.*, 1988).

A linha foi mantida em fase logarítmica de crescimento em meio RPMI/FCS 10% a 37°C, 5% de CO₂ (Dawson *et al.*, 1991). Quando a camada de células se tornou confluenta, as células foram tratadas com tripsina durante 10 minutos a +37°C e a suspensão celular foi dividida em novas aliquotas. Colocaram-se 300 µl da suspensão celular (5×10^5 /ml) em placas de 8 poços Lab Tek e incubou-se a +37°C, 5% de CO₂ durante 24h.

5.1.5.2. Infecção de macrófagos *in vitro*

Os macrófagos diferenciados, foram infectados com o rácio 5:1 durante 24 horas a +37°C, 5% CO₂ em atmosfera húmida (Gomes-Pereira, 2003).

Após 24 horas de infecção os macrófagos foram lavados com tampão PBS, fixados durante 2 minutos com metanol e de seguida corados com solução de Giemsa. Após secagem, os macrófagos foram cobertos por lamelas com montagem em meio de “Entellan”. Determinou-se a percentagem de células infectadas (número de macrófagos parasitados relativamente a um total de 100 células) e a intensidade da

infecção (número de parasitas por macrófago relativamente a um total de 100 células).

As infecções foram realizadas três vezes em condições semelhantes.

5.1.5.3. Determinação de dose máxima tolerada pela linha U-937 aos fármacos

Após análise dos resultados, seleccionou-se a linha celular U937 diferenciada com 50 ng/ml de PMA, para prosseguir o estudo.

A dose máxima tolerada (DMT) pela linha celular U937 aos 4 fármacos em estudo foi determinada tendo em conta as concentrações de fármaco que diminuía em 25% o número de células viáveis quando comparadas com as células selvagens, i.e., que não foram submetidas a qualquer tratamento (Gebre-Hiwot *et al.*, 1992). Após dois dias de diferenciação dos monócitos (5×10^5 /ml) em macrófagos, adicionaram-se diluições seriadas (1:5) dos diferentes fármacos (300 µl/poço). Após 24 horas de incubação a +37°C, 5% de CO₂, o número de células viáveis foi determinado utilizando o azul de Tripan.

A determinação da DMT para cada um dos fármacos em estudo foi realizada cinco vezes independentes em condições semelhantes.

5.1.6. Determinação da susceptibilidade *in vitro* dos amastigotas intramacrofágicos aos fármacos

Depois de se determinar a DMT, prosseguiram-se os ensaios para avaliar *in vitro* a susceptibilidade dos amastigotas intramacrofágicos aos fármacos em estudo.

Após a diferenciação dos monócitos da linha U937 com PMA, os macrófagos foram infectados conforme descrito em 5.2.3.2.1.2. No fim das 24 horas, procedeu-se à lavagem duas vezes com RPMI/FCS 10% para remoção dos promastigotas não fagocitados.

A sete dos oito poços da placa foram adicionadas concentrações seriadas dos diferentes fármacos (Quadro 5.3). Ao oitavo poço adicionou-se RPMI/FCS 10% sem fármaco, de modo a servir como controlo. Após 24 horas de incubação a 37°C, 5% de CO₂, e após remoção do sobrenadante, procedeu-se à permeabilização das células com 200 µl/poço de paraformaldeído (Sigma), durante 10 minutos, de modo a permitir a entrada do corante DAPI que cora o núcleo das células viáveis de azul fluorescente.

Quadro 5.3. Concentrações dos fármacos usadas nos ensaios de susceptibilidade de amastigotas intramacrofágicas de *L. infantum*.

Fármaco	Concentrações							
	1º poço	2º poço	3º poço	4º poço	5º poço	6º poço	7º poço	8º poço
Glucantime (mg/ml)	37,50	9,38	2,34	0,59	0,15	0,04	0,01	0
Anfotericina B (ng/ml)	2000	500	125	31,25	7,81	1,95	0,49	0
Miltefosine (µg/ml)	8000	2000	500	125	31,25	7,81	1,95	0
Alopurinol (µg/ml)	5000	1250	312,50	78,13	19,53	4,88	1,22	0

Após contagem das células ao microscópio de fluorescência calculou-se a percentagem de células infectadas, a intensidade de infecção e o IC50 para cada fármaco como descrito em 5.2.3.2.1.2. e 5.2.3.1.2., respectivamente.

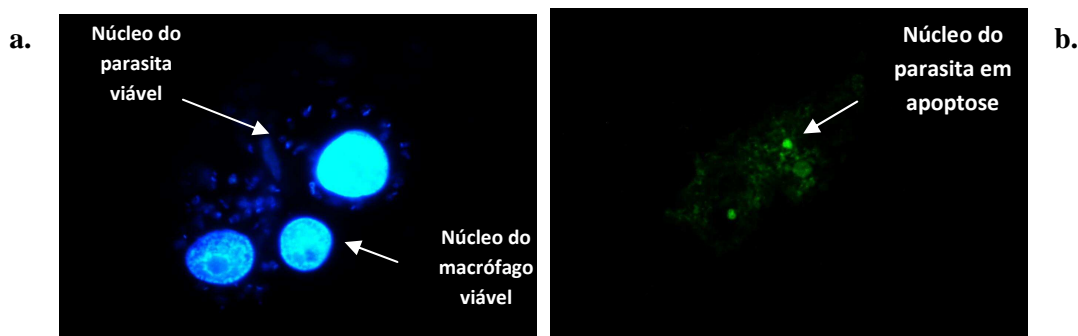
Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

5.1.7. Apoptose nos amastigotas intramacrofágicos por acção dos fármacos

De modo a avaliar a ocorrência de apoptose por acção dos fármacos, os amastigotas intramacrofágicos permeabilizados em 5.2.3.2.5 (Figura 5.1a). foram corados com a mistura do de reagentes do método TUNEL (“*In situ* cell death detection kit, fluorescein”, Roche Diagnostics GmbH), que cora de verde fluorescente o núcleo das células em apoptose (Figura 5.1b).

Após contagem das células ao microscópio de fluorescência calculou-se a percentagem de parasitas apoptóticos (número de amastigotas apoptóticas relativamente a um total de 100 macrófagos).

Figura 5.1. Macrófagos de linha celular humana U937 infectada com formas amastigotas coradas com DAPI, filtro azul (a.) e com a mistura do método TUNEL, filtro verde (b.). Ampliação 100X.



5.1.8. Produção *in vitro* de citocinas

O sistema imunitário do hospedeiro interfere na eficácia terapêutica dos fármacos (Croft, 2001), sendo a acção dos fármacos imunomodulada por citocinas pro- e anti-inflamatórias (Vonk *et al.*, 1998). Este facto tem principal relevância no tratamento das leishmanioses em indivíduos imunodeprimidos, nomeadamente os co-infectados com *Leishmania*-HIV, onde se verifica a ausência de uma resposta celular.

De modo a avaliar a relação entre a concentração de fármaco e a activação dos macrófagos, foi analisada a produção de citocinas nos sobrenadantes das células tratadas com diferentes concentrações dos fármacos em estudo. De modo a obter sobrenadante suficiente (500 µl) para a quantificação de IL-10 e TNF- α pela técnica de ELISA, procedeu-se à metodologia descritas em 5.2.3.2.4., em placas de 24 poços.

Os sobrenadantes foram conservados a -20°C até à sua utilização.

O ensaio de ELISA foi realizado em placas de 96 poços de fundo plano (Maxisorp), as quais foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (100 µl/poço) diluído em tampão de ligação (carbonato de sódio 0.1 M, pH 9.5), específico para a citocina em estudo (BD Biosciences, USA). Após incubação 12-16 horas a $+4^{\circ}\text{C}$, procedeu-se a lavagem com tampão PBS/Tween 20 e bloqueio através da adição e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente de 200 µl/poço de tampão de bloqueio [PBS/FCS 10 % (p/v), pH 7.0].

Após nova lavagem, foram adicionados nos respectivos poços 100 µl das amostras-padrão (com concentrações conhecidas da proteína recombinante, diluídas de 1:2) e 100 µl das amostras de concentração desconhecida. As incubações com o anticorpo de detecção e a adição do substrato TMB foram realizados como descrito em 1.8.2.2.1. A reacção foi então bloqueada com a adição de 40 µl de ácido sulfúrico a 1 M e a absorvância lida a 450 nm.

No quadro 5.4 encontram-se sumarizadas as concentrações dos anticorpos de captura e de detecção utilizadas para cada citocina e os limites superior e inferior de concentração de citocina recombinante das amostras-padrão.

Quadro 5.4. Citocinas estudadas por ELISA "sandwich".

	IL-10		TNF- α	
	Anticorpo de captura	Anticorpo de detecção	Anticorpo de captura	Anticorpo de detecção
Nº Catálogo	51-26171E	51-26172E	51-26371E	51-26372E
Volume (ml)	1	1	1	1
Diluição em tampão	1:250	1:250	1:250	1:250

5.1.9 Mecanismos de quimioresistência: identificação de alterações genéticas e padrões de resistência cruzada

O objectivo deste estudo foi seleccionar *in vitro* parasitas de *Leishmania* resistentes à anfotericina B/Fungizone® (AMB) de modo a avaliar padrões de resistências cruzadas e correlacionar os fenótipos de resistência com polimorfismos genéticos.

5.1.9.1. Selecção *in vitro* de parasitas de *L. infantum* resistentes ao Fungizone® e avaliação de padrões de resistência cruzada (multiresistência)

A selecção de parasitas resistentes à AMB foi executada como descrito em 3.2.2. A concentração do fármaco só era aumentada quando o crescimento dos parasitas sobre pressão era semelhante ao crescimento dos parasitas selvagens (Seifert *et al.*, 2003).

Para avaliar a indução da resistência e a existência de resistência cruzada, determinou-se, usando a metodologia descrita em 5.2.3.1.2., o IC₅₀ dos parasitas em meio de cultura com 160 ng/ml de AMB para os quatro fármacos em estudo.

5.1.9.2. Avaliação da estabilidade do fenótipo de resistência

De modo a avaliar se o fenótipo de resistência dos parasitas era estável, a pressão do fármaco foi retirada dos parasitas em cultura em meio com 160ng/ml de AMB. O IC₅₀ foi determinado 4 semanas após remoção do fármaco.

5.1.9.3. Correlação entre fenótipos de resistência e alterações no gene *mdr*

De modo a correlacionar a resposta *in vitro* das estirpes de *L. infantum* aos fármacos com alterações nas sequências do gene *mdr*, foram desenhados 10 pares de sequências iniciadoras (Quadro 5.5), as quais foram desenhadas com base na sequência do gene *mdr1* de *L. infantum* incluída no Gene DB(LinJ34_V3.1060). Os fragmentos foram amplificados por PCR com as condições descritas no quadro 5.6.

Quadro 5.5. Sequências iniciadoras e tamanho dos produtos de amplificação dos fragmentos do gene *mdr*.

Gene	Tamanho do produto (pb)	"Forward" a)	"Reverse" b)
<i>mdr1</i>	452	5'-CACGGAGGAAAAGTACCGACT-3'	5'-GTCAGCTGTGTCAGCGTAGC-3'
<i>mdr2</i>	517	5'-AGCAGGCACAATCCTCTGTT-3'	5'-CGATGTAGCCGATGATACCC-3'
<i>mdr3</i>	501	5'-CTGAACCTCTTCGCGCTGT-3'	5'-GAAAAAGGCGATGGTGTAGC-3'
<i>mdr4</i>	504	5'-TTGCTGAAGCGGTCCTGTA-3'	5'-GGTCGTAGAAGCGCTGGAT-3'
<i>mdr5</i>	501	5'-ATGATACTGTTCCGCGACCT-3'	5'-CAGTGAACGCTGTACCTCCA-3'
<i>mdr6</i>	542	5'-GGGCAGAAGCAGCGAATC-3'	5'-ACAGCCCACGATTGTCTTT-3'
<i>mdr7</i>	599	5'-GGCAAATGACTTCCTGAACG-3'	5'-CCACAATTCCAGAAGCAACA-3'
<i>mdr8</i>	577	5'-TTGCTGTCCGTCAGATCAT-3'	5'-CACCGAACAGGATCGACAT-3'
<i>mdr9</i>	694	5'-GTAGAGGTGCCGCTAGTGT-3'	5'-TCATGATCTCCAGTGGATG-3'
<i>mdr10</i>	583	5'-CAGGAGCCGAATCTGTTCA-3'	5'-ACGATCCCTCCGTGGTAGA-3'

a) "forward": sequência a jusante da região a estudar

b) "reverse": sequência a montante da região a estudar

pb: pares de bases

Os fragmentos foram amplificados por PCR com as condições descritas no quadro 5.6.

Quadro 5.6. Condições de amplificação para o gene *mdr*.

Gene	Desnaturação inicial	Desnaturação	Ligação	Alongação	Nº ciclos	Alongação final
<i>mdr1</i> ; <i>mdr2</i> ; <i>mdr9</i>			60°C, 30 seg		30	
<i>mdr3</i> ; <i>mdr10</i>			59°C, 30 seg		35	
<i>mdr4</i>			60°C, 30 seg		45	
<i>mdr5</i> ; <i>mdr7</i> ; <i>mdr8</i>			60°C, 30 seg		35	
<i>mdr6</i>	95°C, 3 min	94°C, 20 seg	65°C, 30 seg	72°C, 45 seg	35	72°C, 7 min

Os fragmentos resultantes das amplificações por PCR foram visualizados em gel de agarose a 1.5%. Para garantir a qualidade da sequenciação, os produtos de PCR foram purificados ("High Pure PCR Product Purification Kit", Roche Diagnostics GmbH), de modo a remover as sequências iniciadoras, os nucleótidos e outros sais resultantes da PCR. A purificação consistiu na retenção do DNA amplificado através de uma série de lavagens e centrifugações. Por fim, o DNA foi eluído através de uma solução de baixa concentração salina. Os produtos assim obtidos foram directamente sequenciados no sentido da cadeia codificante 5'→3' pelos serviços da StabVida (Portugal), utilizando as mesmas sequências iniciadoras da amplificação. O sequenciador utilizado foi o "ABIPRISM 3700 DNA Analyzer". A análise das sequências nucleotídicas obtidas foi efectuada através de alinhamentos entre a sequência obtida e a sequência contida no Gene DB.

5.1.10. Análise estatística

A análise estatística foi efectuada no programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., USA). O teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar a percentagem de células infectadas e o número de parasitas por cada 100 células dos diferentes cinco tipos de macrófagos, infectados com IMT 151 e IMT 373, assim como para a linha celular U937 infectada com as estirpes em estudo. Quando a hipótese nula (não há diferenças entre as medianas) foi rejeitada, múltiplas comparações de Friedman foram realizadas para determinar qual o tipo de macrófago que foi estatisticamente diferente, utilizando um nível de significância de 5% (Mello, 1997). O teste de “Wilcoxon” foi realizado para comparar a infecção entre as duas estirpes de *L. infantum* e a estirpe 373WT e a 373R160.

O teste de Spearman foi utilizado para determinar o coeficiente de correlação entre o IC50 obtido com os sistema de promastigotas com o obtido com o sistema de amastigota-macrófago.

5.2. Resultados

Parte destes resultados foram apresentados no X Congresso Português de Parasitologia (Lisboa, Outubro 2006), nos workshops “Control of Leishmaniasis with drugs” (Lanarca, Novembro 2006) e “Training course on GIS and environmental control” (Tunes, Setembro 2007) incluídos no projecto Europeu “Monitoring risk factors of spreading of leishmaniasis around the Mediterranean basin” e publicados na *Acta Tropica* (Maia *et al.*, 2007c).

Modelo *in vitro* para o estudo da susceptibilidade de *Leishmania* a diferentes fármacos

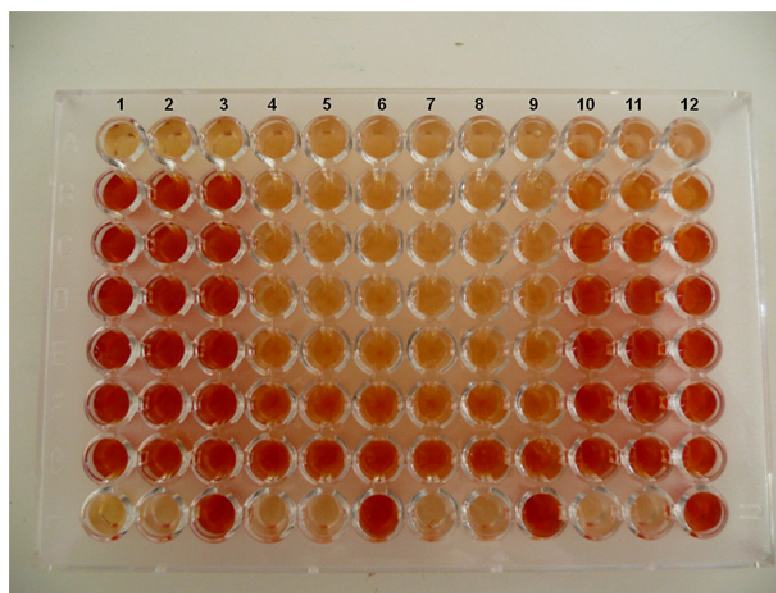
5.2.1. Sistema promastigotas axénicos

Após o período de optimização da concentração de fármaco inicial, da concentração de promastigotas e dos tempos de incubação, avaliou-se a sensibilidade do parasita aos quatro fármacos em estudo, utilizando-se diferentes técnicas laboratoriais.

Nas técnicas de determinação das actividades da fosfatase ácida e da lactato desidrogenase, a interferência da cor dos fármacos Fungizone® e Alopurinol produziu um elevado “background” na leitura da absorvância. No caso da lactato desidrogenase verificou-se ainda uma reacção com o FCS, usado no meio de cultura dos promastigotas. Na técnica de Picogreen®, apesar dos bons resultados obtidos com as estirpes selvagens, a sua performance nessas mesmas estirpes tratadas com os fármacos Miltefosine e Glucantime® revelou uma elevada variação inter-ensaio, pelo que os resultados foram considerados não satisfatórios. O mesmo ocorreu com a contagem microscópica dos parasitas viáveis 48 horas após adição das concentrações seriadas dos diferentes fármacos.

Concluiu-se que a técnica de XTT (Figura 5.2) foi a que apresentou menos variação inter-ensaio pelo que se optou pela sua utilização para estudar *in vitro* a susceptibilidade dos promastigotas axénicos de *Leishmania* aos fármacos.

Figura 5.2. Placa de XTT com promastigotas tratados com diluições seriadas dos quatro fármacos em estudo. Linhas 1-3: Glucantime®; Linhas 4-6: Fungizone®; Linhas 7-9: miltefosine; Linhas 10-12: alopurinol.



Após análise dos resultados foram seleccionados os seguintes parâmetros:

- Concentração dos promastigotas: 1×10^6 promastigotas/ml.
- Concentração inicial de cada fármaco: Glucantime® - 300 mg/ml; Fungizone® - 2 µg/ml; miltefosine – 100 µg/ml; alopurinol – 5 mg/ml.

O Glucantime® e o alopurinol foram diluídos em meio de Schneider em 1:2, e o Fungizone® e o miltefosine em 1:4.

- Tempo de incubação: 48 horas.

5.2.2. Determinação da susceptibilidade *in vitro* dos promastigotas axénicos aos fármacos

Para cada estirpe analisada realizaram-se dois ensaios independentes com cada fármaco e em triplicado. Determinou-se a dose de fármaco que inibe em 50% o crescimento parasitário (IC₅₀) para cada uma das estirpes e para cada um dos quatro fármacos em estudo. Os IC₅₀ resultaram da média das seis contagens (Quadro 5.7).

Quadro 5.7. IC₅₀ das formas promastigotas de cada uma das estirpes de *Leishmania* para cada fármaco.

Fármacos/Estirpes	IC ₅₀				
	IMT373	IMT151	IMT184	IMT211	IMT369
Glucantime® (mg/ml)	71,24	23,49	110,89	34,99	128,54
Fungizone® (ug/ml)	0,16	0,19	0,03	0,03	0,64
Miltefosine (ug/ml)	4,07	17,61	1,79	35,42	8,65
Alopurinol (mg/ml)	0,59	2,78	1,36	1,24	0,45

Após determinação do IC₅₀, verificou-se que no caso do fármaco Glucantime® a estirpe *L. infantum* IMT369 (isolada de um humano imunocompetente após falha terapêutica com este mesmo fármaco) apresentou o IC₅₀ mais elevado (128,24 mg/ml). Seguiu-se a concentração relativa à estirpe IMT184 (isolada de um humano imunodeprimido sem tratamento) com 110,89 mg/ml, a da estirpe IMT373 (isolada de um canídeo sem tratamento) com 71,24 mg/ml, e a da estirpe híbrida *L. infantum/L. major* IMT211 (isolada de um humano imunodeprimido após tratamento com Glucantime® e Fungizone®), com 34,99 mg/ml e, por fim, 23,49 mg/ml referente à estirpe IMT151 (isolada de um humano imunocompetente sem tratamento).

Em relação ao fármaco Fungizone®, a estirpe IMT369 apresentou novamente o IC50 mais elevado (640 ng/ml) seguindo-se a estirpe IMT151 com 188 ng/ml, a estirpe IMT373 com 155 ng/ml, e por fim, as estirpes IMT184 e IMT211 com 34 ng/ml.

Em relação ao fármaco miltefosine a estirpe com IC50 mais elevado foi a estirpe IMT211 com 35,42 µg/ml, seguindo-se a estirpe IMT151 com 17,61 µg/ml, a estirpe IMT369 com 8,65 µg/ml, a estirpe IMT373 com 4,072 µg/ml e, por fim a estirpe IMT184 com 1,79 µg/ml.

Para o fármaco alopurinol a estirpe IMT151 apresentou o IC50 mais elevado (2,783 mg/ml), seguindo-se a estirpe IMT184 com 1,36 mg/ml, a estirpe IMT211 com 1,24 mg/ml, a estirpe IMT373 com 0,591 mg/ml e, por fim, a estirpe IMT369 com 0,45 mg/ml.

5.2.3. Sistema amastigota-macrófago

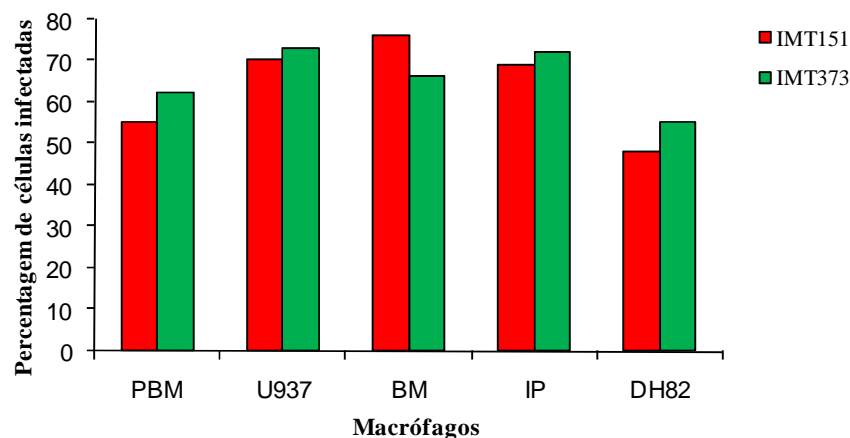
5.2.3.1. Seleção do sistema de macrófagos

Os resultados apresentados correspondem à mediana de 3 ensaios independentes.

A percentagem de células infectadas com a estirpe de *L. infantum* humana IMT151 e canina IMT373, variou entre 48 a 76% e 55 a 75% respectivamente (Figura 5.4); não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na infectividade de cada tipo de macrófagos por ambas as estirpes ($p>0.25$).

Obteve-se diferenças significativas na permissividade dos diferentes tipos de macrófagos à infecção com *L. infantum* IMT151 ($p=0.004$) e IMT373 ($p=0.021$), sendo os macrófagos derivados do sangue periférico e da linha celular canina DH82 menos permissivos à infecção pelo parasita. Entre os outros três tipos de macrófagos (U937, medula óssea e peritoneu) não houve diferenças significativas na infecção com a estirpe IMT373, mas no caso da estirpe IMT151 o número de macrófagos da medula óssea infectados foi superior ao número de macrófagos do peritoneu de murganho infectados.

Figura 5.4. Mediana da percentagem de células infectadas nos diferentes tipos de macrófagos, com as estirpes *L. infantum* IMT151 e IMT373.

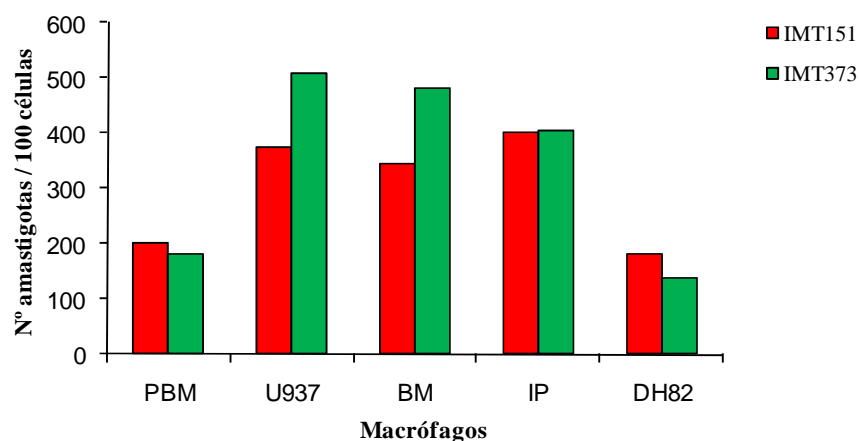


PBM: Macrófagos derivados dos monócitos do sangue periférico humano; U937: Macrófagos diferenciados a partir de uma linha celular humana; BM: Macrófagos derivados da medula óssea de BALB/c; IP: Macrófagos peritoneais de BALB/c; DH82: Macrófagos da linha celular canina.

Em relação à intensidade de infecção, isto é, o número de amastigotas por 100 células hospedeiras, este foi inferior nos macrófagos do sangue periférico e da linha celular canina DH82 ($p=0.026$). Múltiplas comparações efectuadas no programa SPSS 13.0, demonstraram que não existiram diferenças significativas entre estes dois tipos de macrófagos. No entanto foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre PBM ou DH82 e os restantes três tipos (U937, IP e BM). Nos três sistemas constituídos pelos macrófagos da linha celular humana U937, da medula óssea e do peritoneu de murganho, não existiram diferenças estatisticamente significativas para ambas as estirpes infectantes de *L. infantum*.

A intensidade de infecção entre as duas estirpes infectantes em cada tipo de macrófagos utilizado não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0.25$) (Figura 5.5).

Figura 5.5. Mediana do número de amastigotas de *L. infantum* IMT151 e IMT373 por 100 macrófagos.



PBM: Macrófagos derivados dos monócitos do sangue periférico humano; U937: Macrófagos diferenciados a partir de uma linha celular humana; BM: Macrófagos derivados da medula óssea de BALB/c; IP: Macrófagos peritoneais de BALB/c; DH82: Macrófagos da linha celular canina.

Concluiu-se que os sistemas U937, IP e BM são os que apresentam maior capacidade de fagocitar os parasitas, pelo que podem ser utilizados como modelo para testar a susceptibilidade da *Leishmania* a diferentes fármacos. Contudo, a linha celular U937 ao ser de obtenção menos morosa e dispendiosa que os outros tipos de macrófagos foi a escolhida para estudar *in vitro* a susceptibilidade das formas amastigotas de *Leishmania* aos fármacos em estudo.

5.2.3.2. Determinação de dose máxima tolerada pela linha U-937 aos fármacos

Obteve-se uma dose máxima tolerada (DMT) de 8 µg/ml para o Miltefosine, 200 µg/ml para o Fungizone®, 5 mg/ml para o Alopurinol e 37,7 mg/ml para o Glucantime®. A DMT para cada fármaco foi a concentração máxima utilizada para testar *in vitro* a susceptibilidade dos amastigotas aos diferentes fármacos em estudo.

5.2.3.3. Determinação da susceptibilidade *in vitro* dos amastigotas intramacrofágicos aos fármacos

Para cada estirpe analisada realizaram-se dois ensaios independentes com cada fármaco. Determinou-se o IC₅₀ para cada uma das estirpes e para cada um dos quatro fármacos. Os IC₅₀ resultaram da média das duas contagens (Quadro 5.8). Observou-se uma correlação positiva entre o IC₅₀ das formas promastigotas e o IC₅₀ das formas amastigotas nas estirpes IMT373, IMT184 e IMT369 ($r=1$, $p<0.01$).

Quadro 5.8. IC₅₀ das formas amastigotas de cada uma das estirpes de *Leishmania* para cada fármaco.

Fármacos/Estirpes	IC ₅₀					
	IMT373	IMT352	IMT151	IMT184	IMT211	IMT369
Glucantime® (mg/ml)	36,28	0,32	3,55	22,28	6,07	12,23
Fungizone® (ug/ml)	0,29	7,29	1,09	1,77	1,03	9,62
Miltefosine (ug/ml)	4,58	1,04	4,49	8,22	4,78	10,10
Alopurinol (mg/ml)	2,44	1,76	1,58	2,99	0,64	1,90

Após determinação do IC₅₀ para as estirpes de *Leishmania* em estudo, verificou-se que no caso do fármaco Glucantime® a estirpe IMT373 apresentou o IC₅₀ mais elevado (36,28 mg/ml). Seguiu-se a estirpe IMT184 com 22,28 mg/ml, a IMT369 com 12,23 mg/ml, a IMT211 com 6,07 mg/ml, a IMT151 com 28,45 mg/ml e, por fim, a estirpe IMT352 com 0,32 mg/ml.

Em relação ao fármaco Fungizone®, a estirpe IMT369 apresentou o IC₅₀ mais elevado (9,62 ng/ml) seguindo-se a IMT352 com 7,29 ng/ml, a IMT184 com 1,77 ng/ml, a IMT151 com 1,09 ng/ml, a IMT211 com 1,03 ng/ml, e por fim, a estirpe IMT373 com 0,29 ng/ml.

Em relação ao fármaco miltefosine a estirpe com IC₅₀ mais elevado foi a estirpe IMT369 com 10,10 µg/ml, a estirpe IMT184 com 8,22 µg/ml, seguindo-se a estirpe IMT211 com 4,78 µg/ml, a IMT373 com 4,58 µg/ml, a estirpe IMT151 com 4,49 µg/ml e, por fim a estirpe IMT352 com 1,04 µg/ml.

Para o fármaco alopurinol a estirpe IMT184 apresentou o IC₅₀ mais elevado (2,99 mg/ml), seguindo-se a estirpe IMT373 com 2,44 mg/ml, a estirpe IMT369 com 1,90 mg/ml, a estirpe IMT352 com 1,76 mg/ml, a estirpe IMT151 com 1,58 mg/ml e, por fim, a estirpe IMT211 com 0,64 mg/ml.

5.2.4. Mecanismos de quimioresistência: identificação de alterações genéticas e padrões de resistência cruzada

5.2.4.1. Selecção *in vitro* de parasitas de *Leishmania* resistentes ao Fungizone® e avaliação de padrões de resistência cruzada

5.2.4.1.1. Formas promastigotas

Após a determinação do IC₅₀ das estirpes selvagens de *Leishmania* para os fármacos em estudo, induziu-se pressão nos parasitas através do aumento gradual de anfotericina B no meio de cultura. Após indução de pressão com 160 ng/ml de fármaco (R160), determinou-se o IC₅₀ para os quatro fármacos e comparou-se este valor com o IC₅₀ da estirpe selvagem (WT) de modo a calcular o índice de resistência ($IR = IC_{50}R160/IC_{50} WT$) (Quadro 5.9).

Verificou-se que no caso do fármaco Glucantime® as estirpes IMT373R160, IMT151R160 e IMT369R160 ficaram mais susceptíveis à sua acção enquanto que a estirpe IMT184R160 ficou 1,04 vez menos susceptível e a estirpe IMT211R160 quase que triplicou a dose de fármaco necessária para inibir o seu crescimento em 50% ($IR = 2,92$).

Em relação ao fármaco Fungizone®, verificou-se que as estirpes IMT373R160 e IMT211R160 apresentaram um IR cerca de duas vezes e meia superior ao das estirpes WT enquanto que as estirpes IMT352R160 e IMT369R160 ficaram cerca de uma vez e meia menos susceptíveis a este fármaco. A única excepção foi a estirpe IMT151 que após tratamento com anfotericina B ficou mais susceptível à sua acção.

Em relação ao miltefosine os IR das estirpes IMT211R160, IMT151R160, IMT369R160 diminuíram enquanto que os das estirpes IMT373R160 e IMT184R160 aumentaram 6,13 e 4,86 vezes, respectivamente.

Todas as estirpes em cultura com 160ng/ml de anfotericina B ficaram mais susceptíveis à acção do alopurinol.

Quadro 5.9. IC50 e IR das formas promastigotas de cada uma das estirpes de *Leishmania* em meio sem fármaco (WT) e em meio com 160ng/ml de anfotericina B (R160) para cada fármaco em estudo.

Fármacos/Estirpes	IC50														
	IMT373			IMT151			IMT184			IMT211			IMT369		
	WT	R160	IR	WT	R160	IR	WT	R160	IR	WT	R160	IR	WT	R160	IR
Glucantime® (mg/ml)	71,24	38,83	0,55	23,49	13,51	0,58	110,89	115,88	1,04	34,99	102,15	2,92	128,54	30,26	0,24
Fungizone® (ug/ml)	0,16	0,41	2,62	0,19	0,07	0,38	0,03	0,04	1,33	0,03	0,08	2,35	0,64	0,94	1,47
Miltefosine (ug/ml)	4,07	24,97	6,13	17,61	3,82	0,22	1,79	8,67	4,86	35,42	18,92	0,53	8,65	3,89	0,45
Alopurinol (mg/ml)	0,59	0,04	0,06	2,78	0,10	0,04	1,36	0,65	0,48	1,24	1,07	0,86	0,45	0,26	0,58

5.2.4.1.2. Formas amastigotas

Utilizaram-se os promastigotas da estirpe IMT373R160 para infectar as células da linha U937 de modo a determinar o IC₅₀ para os quatro fármacos (Quadro 5.10). Este IC₅₀ foi então comparado com o IC₅₀ obtido para a estirpe WT de modo a calcular o IR.

Quadro 5.10. IC₅₀ e IR das formas amastigotas da estirpe IMT373 em meio sem fármaco (WT) e em meio com 160ng/ml de anfotericina B (R160) para cada fármaco em estudo.

Fármacos/Estirpe	IC ₅₀		
	IMT373WT	IMT373R160	IR
Glucantime® (mg/ml)	36,28	65,62	1,81
Fungizone® (ug/ml)	0,29	1,57	5,32
Miltefosine (ug/ml)	4,58	9,76	2,13
Alopurinol (mg/ml)	2,44	3,23	1,32

Da comparação do IC₅₀ das formas amastigotas da estirpe IMT373R160 e o IC₅₀ da estirpe WT, verificou-se que a estirpe ficou menos susceptível à acção dos quatro fármacos, apresentando o índice de resistência (5,32) mais elevado no caso do Fungizone®.

No caso do Glucantime® foi necessário uma concentração 1,8 vezes superior para inibir em 50% o número de parasitas intracelulares enquanto que para o miltefosine foram necessárias cerca de duas vezes mais (2,13). O menor aumento de IR ocorreu com o alopurinol (IR=1,32).

5.2.4.2. Avaliação da estabilidade do fenótipo de resistência

Após se retirar a pressão do fármaco sobre os parasitas IMT373R160 e IMT151R160 determinou-se 4 semanas depois (S) o IC₅₀ para os quatro fármacos e calculou-se o IR (= IC₅₀S/IC₅₀R160) (Quadro 5.11).

A estirpe IMT373S ficou menos susceptível ao tratamento com o Glucantime® (IR =2,56) e alopurinol (IR = 1,52). Por outro lado, o seu IC₅₀ demonstrou que a sua susceptibilidade ao Fungizone® e miltefosine aumentou.

A estirpe IMT151S apenas apresentou um IR mais elevado à acção do Fungizone® (IR=1,67), ficando mais susceptível ao tratamento com os outros fármacos.

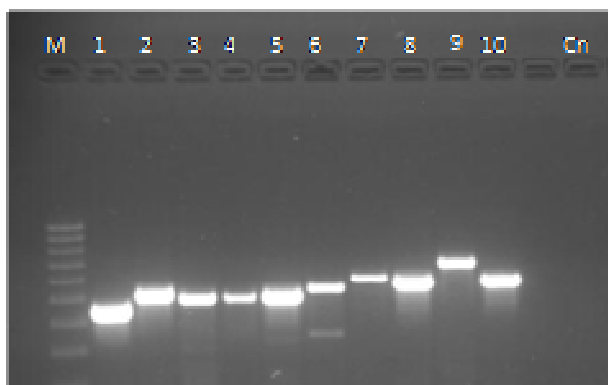
Quadro 5.11. IC₅₀ e IR das formas promastigotas das estirpes IMT151 e IMT373 em meio com 160ng/ml de anfotericina B (R160) e 4 semanas após remoção do fármaco (S) para cada fármaco em estudo.

Fármacos/Estirpes	IC ₅₀					
	IMT373R160	IMT373S	IR	IMT151R160	IMT151S	IR
Glucantime® (mg/ml)	38,83	99,12	2,55	13,51	2,78	0,21
Fungizone® (ug/ml)	0,41	0,25	0,60	0,07	0,12	1,67
Miltefosine (ug/ml)	24,97	4,76	0,19	3,82	2,19	0,57
Alopurinol (mg/ml)	0,04	0,06	1,53	0,10	0,00	0,00

5.2.4.3. Fenótipos de resistência e alterações do gene *mdr*

O gene *mdr* foi sequenciado a partir do DNA das estirpes de *Leishmania* em estudo. Todos os fragmentos resultantes das amplificações por PCR foram visualizados em gel de agarose a 1.5% antes de serem sequenciados (Figura 5.6).

Figura 5.6. Amplificação dos diferentes fragmentos do gene *mdr* pela técnica de PCR.



Legenda: M – Marcador molecular (100pb); 1 a 10 – Fragmentos amplificados do gene *mdr*; Cn – controle negativo

Após a visualização dos produtos de PCR em gel de agarose, todas as bandas dos produtos amplificados foram separadas, purificadas e sequenciadas. As sequências das estirpes selvagem (WT) e tratadas com 160 ng/ml de anfotericina B (R160) foram alinhadas e analisadas com o programa “Blast 2 Sequences”, de modo a serem comparadas entre si, para pesquisa de eventuais alterações genéticas (Quadro 5.12).

Neste trabalho foram consideradas as alterações que foram detectadas na maioria das estirpes na mesma região da sequência. Só foi possível comparar a estirpe IMT352WT com as outras estirpes já que, por motivo de contaminações da cultura não foi possível obter a forma resistente a 160 ng/ml de anfotericina. Foram encontradas dez alterações pontuais entre as sequências das estirpes. Duas das alterações observadas nas estirpes IMT373R160, IMT151R160, IMT184R160 e IMT211R160 correspondem a diferentes aminoácidos. A mutação presente nas formas R160, deu origem ao mesmo aminoácido presente na IMT352WT. Não se observaram alterações entre a forma selvagem e resistente da IMT369.

Quadro 5.12. Alterações nucleotídicas detectadas no gene *mdr* de *L. infantum* após alinhamento das sequências das estirpes WT e R160.

Estirpes		Sequência do <i>mdr</i>	Tipo de alteração	Aminoácido
IMT373	WT	-GGG-	s.a.	Glicina
	R160	- <u>A</u> GG-	a.p.N	Arginina
IMT151	WT	-GGG-	s.a.	Arginina
	R160	- <u>A</u> GG-	a.p.N	Glicina
IMT184	WT	-AGG-	s.a.	Arginina
	R160	-AGG-	s.a.	Arginina
IMT211	WT	-AGG-	s.a.	Arginina
	R160	-AGG-	s.a.	Arginina
IMT373	WT	-AGT-	s.a.	Serina
	R160	-AG <u>C</u> -	a.p.N	Serina
IMT151	WT	-AGT-	s.a.	Serina
	R160	-AG <u>C</u> -	a.p.N	Serina
IMT184	WT	-AGC-	s.a.	Serina
	R160	-AGC-	s.a.	Serina
IMT211	WT	-AGC-	s.a.	Serina
	R160	-AGC-	s.a.	Serina
IMT373	WT	-GAC-	s.a.	Prolina
	R160	-G <u>C</u> G-	a.p.N	Alanina
IMT151	WT	-CCG-	s.a.	Ácido Aspártico
	R160	-G <u>C</u> G-	a.p.N	Alanina
IMT184	WT	-GCG-	s.a.	Alanina
	R160	-GCG-	s.a.	Alanina
IMT211	WT	-GCG-	s.a.	Alanina
	R160	-GCG-	s.a.	Alanina
IMT373	WT	-AGA-	s.a.	Arginina
	R160	-AGA-	s.a.	Arginina
IMT151	WT	-AGA-	s.a.	Arginina
	R160	-AGA-	s.a.	Arginina
IMT184	WT	-AGA-	s.a.	Arginina
	R160	- <u>C</u> AG-	a.p.T	Glutamina
IMT211	WT	-AGA-	s.a.	Arginina
	R160	- <u>C</u> AG-	a.p.T	Glutamina
IMT373	WT	-CGA-	s.a.	Arginina
	R160	-CGA-	s.a.	Arginina
IMT151	WT	-CGA-	s.a.	Arginina
	R160	-CGA-	s.a.	Arginina
IMT184	WT	-CGA-	s.a.	Arginina
	R160	- <u>C</u> CA-	a.p.N	Prolina
IMT211	WT	-CGA-	s.a.	Arginina
	R160	- <u>C</u> CA-	a.p.N	Prolina

mdr: gene "multi drug resistance"; WT: estirpe selvagem; R160: estirpe tratada com 160ng/ml de anfotericina B; s.a.: sem alteração; a.p.N: alteração pontual num único nucleótido; a.p.T: alteração pontual num tripleto

5.2.5. Avaliação da ocorrência de apoptose nos amastigotas intramacrofágicos

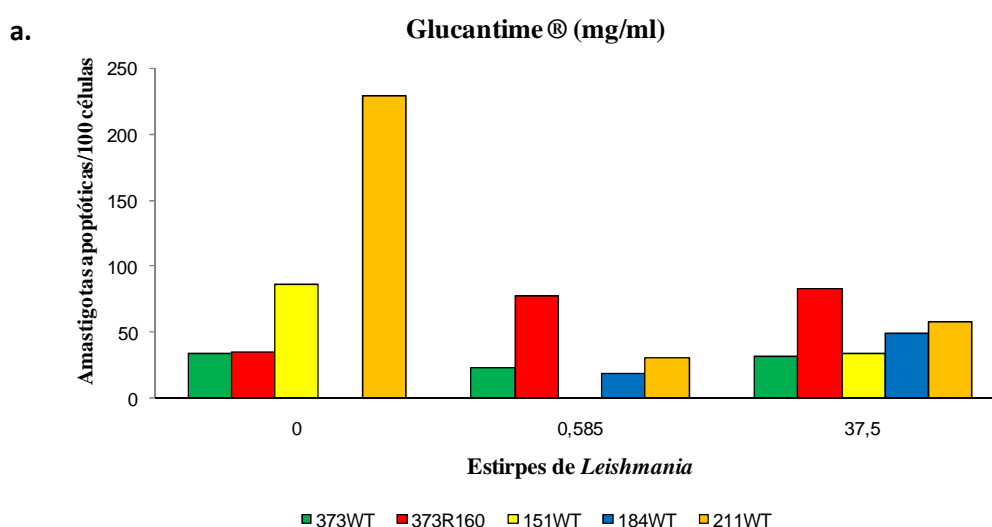
Foram analisadas as estirpes selvagens IMT373WT, IMT151WT, IMT184WT e IMT211WT e a tratada IMT373R160. Para cada estirpe realizaram-se dois ensaios independentes com cada fármaco. Na Figura 5.7 estão representadas as médias dos dois ensaios.

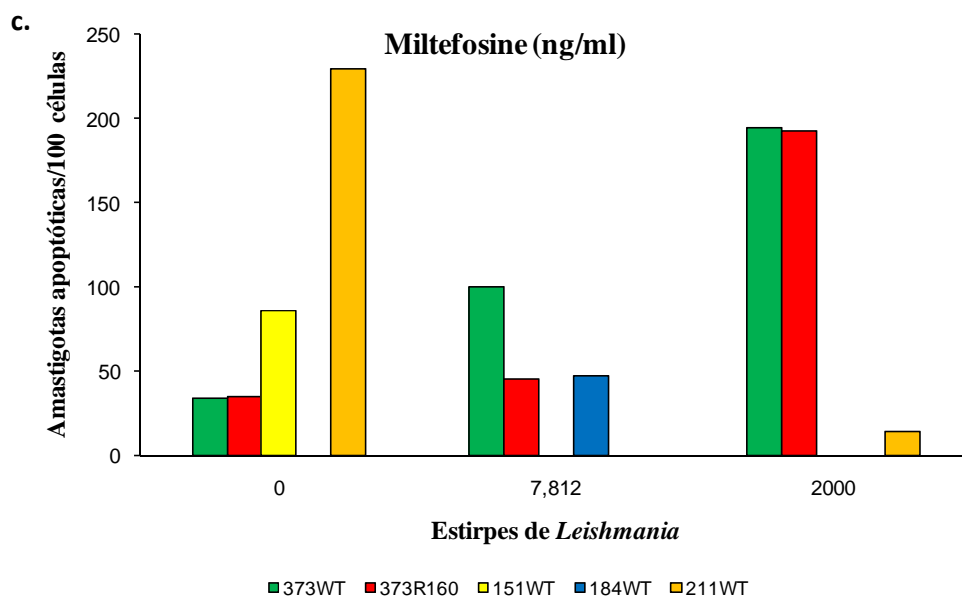
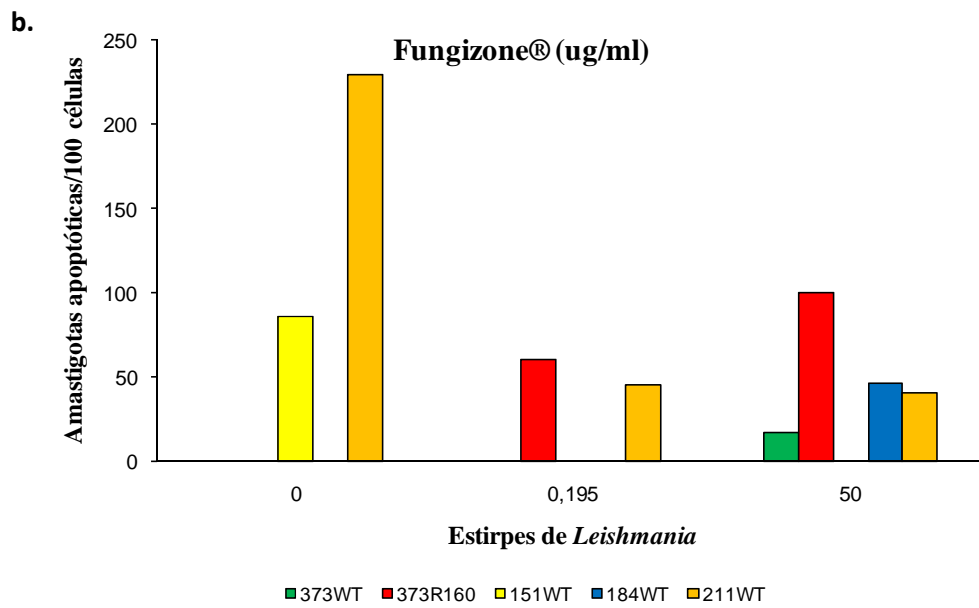
No caso das estirpes IMT184WT e IMT373R160, o número de parasitas em apoptose aumentou com o aumento da concentração de Glucantime® e no caso da estirpe IMT373WT o número de amastigotas apoptóticas foi semelhante com ou sem fármaco.

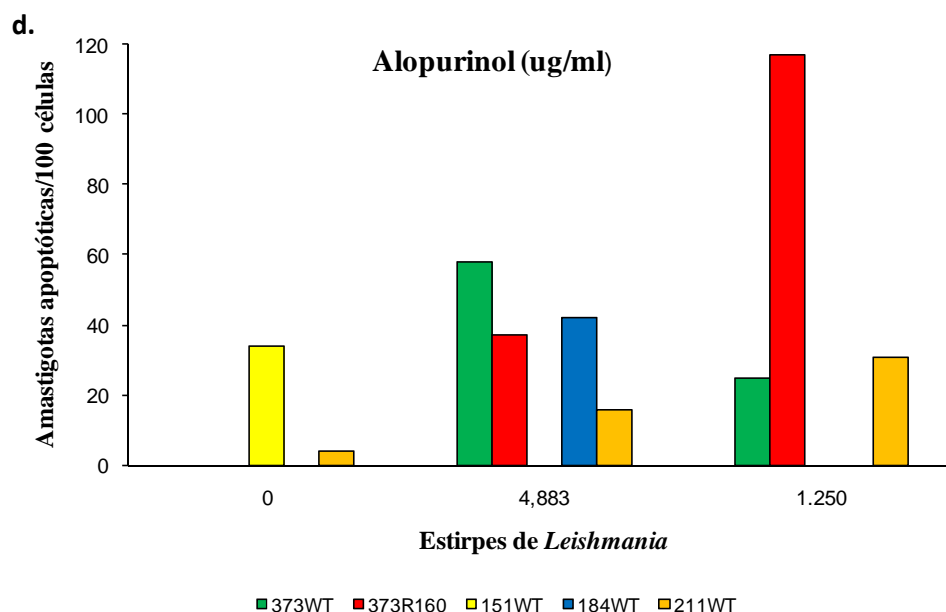
Com o fármaco Fungizone® verificou-se, com a concentração mais elevada testada, um aumento de leishmanias apoptóticas das estirpes IMT184WT, IMT373WT e IMT373R160. O mesmo foi observado nas estirpes IMT373WT e IMT373R160 com o miltefosine.

Nas células infectadas com IMT151WT e tratadas com Fungizone®, com miltefosine ou com alopurinol não se observaram parasitas apoptóticos. As células infectadas com a estirpe IMT211WT e tratadas apresentaram, com exceção do fármaco alopurinol, um menor número de parasitas apoptóticos do que as células controlo não tratadas.

Figura 5.7. Número de formas amastigotas apoptóticas nos macrófagos tratados com Glucantime® (a.), Fungizone® (b.), miltefosine (c.) e alopurinol (d.).







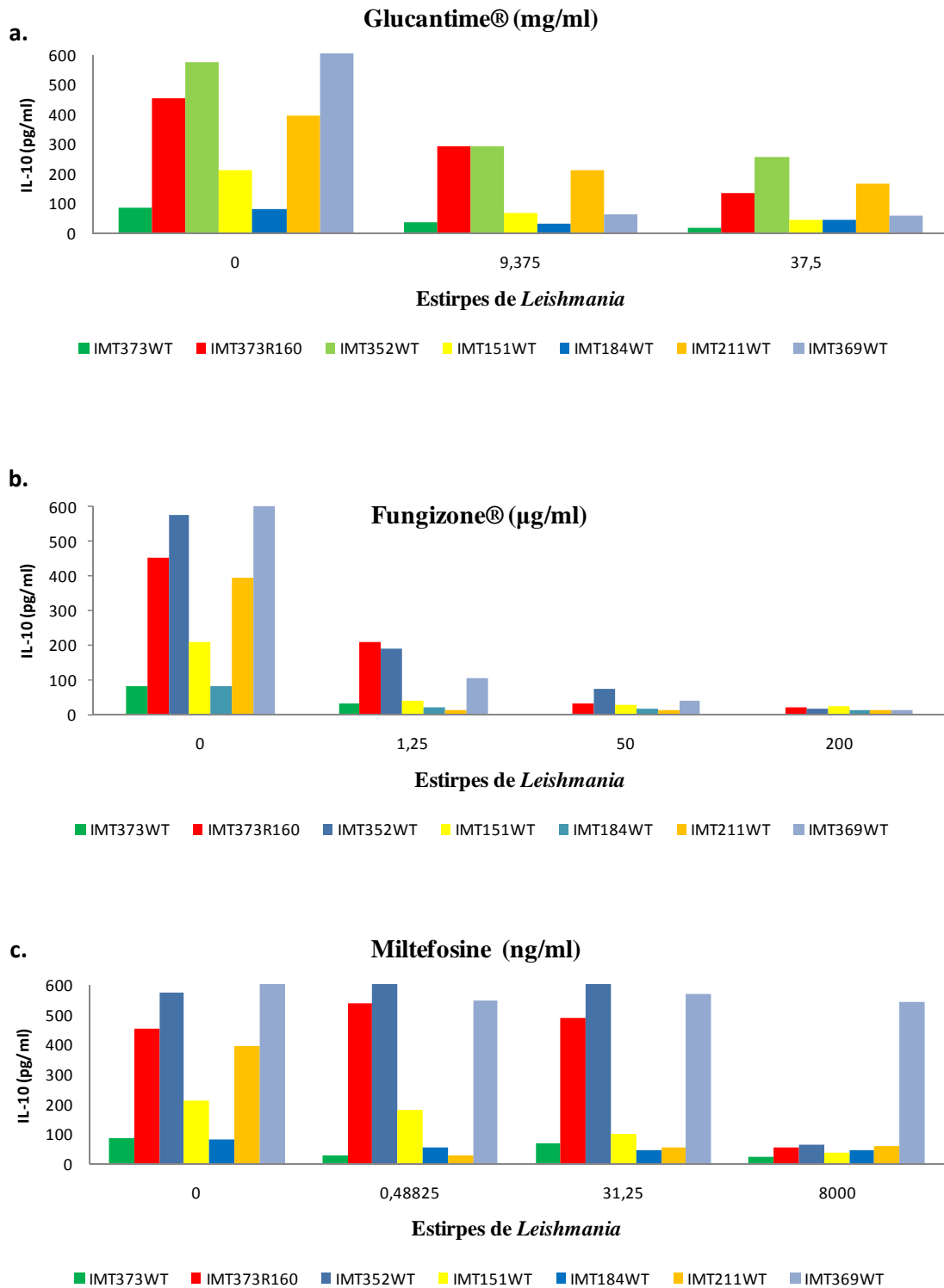
5.2.6. Avaliação da produção *in vitro* de citocinas

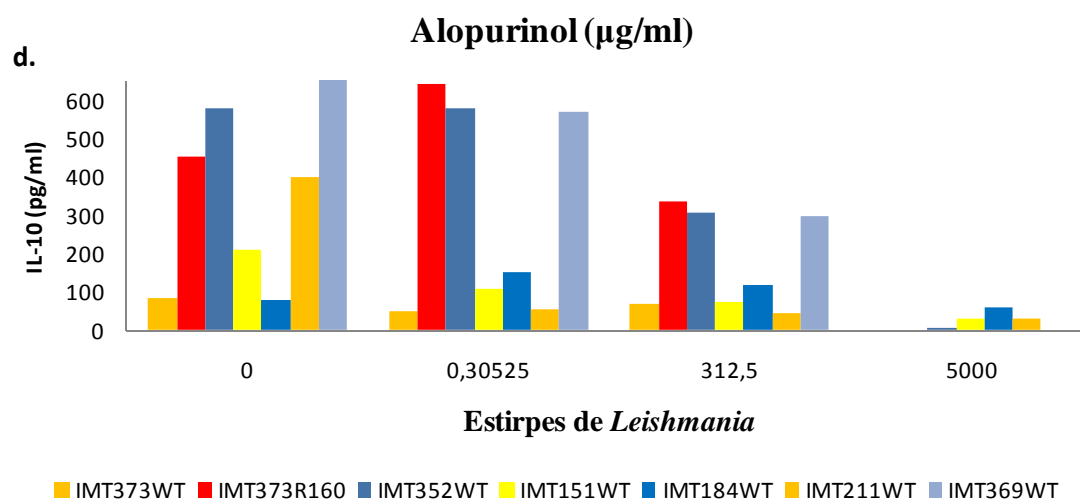
Para cada estirpe analisada realizaram-se dois ensaios independentes com cada fármaco. Determinou-se a produção das citocinas IL10 e TNF- α pelos macrófagos da linha humana U937 infectados com as seis estirpes selvagens e a estirpe IMT373R160 para cada um dos quatro fármacos em estudo. Os resultados são a média das duas contagens.

5.2.6.1. Produção de IL-10

Os macrófagos infectados e tratados com os diferentes fármacos apresentaram de um modo geral, uma menor produção de IL-10 do que os macrófagos não tratados (Figura 5.8).

Figura 5.8. Produção de IL-10 pelos macrófagos da linha U937 infectados com as estirpes selvagens de *Leishmania* e IMT373R16 e tratados com diluições seriadas de Glucantime® (a.), Fungizone® (b.), miltefosine (c.) e alopurinol (d.).

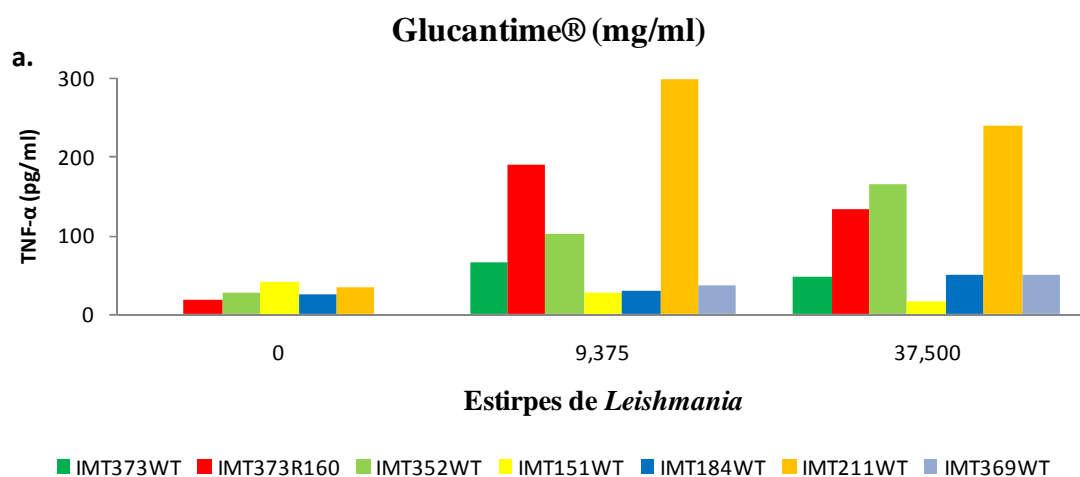


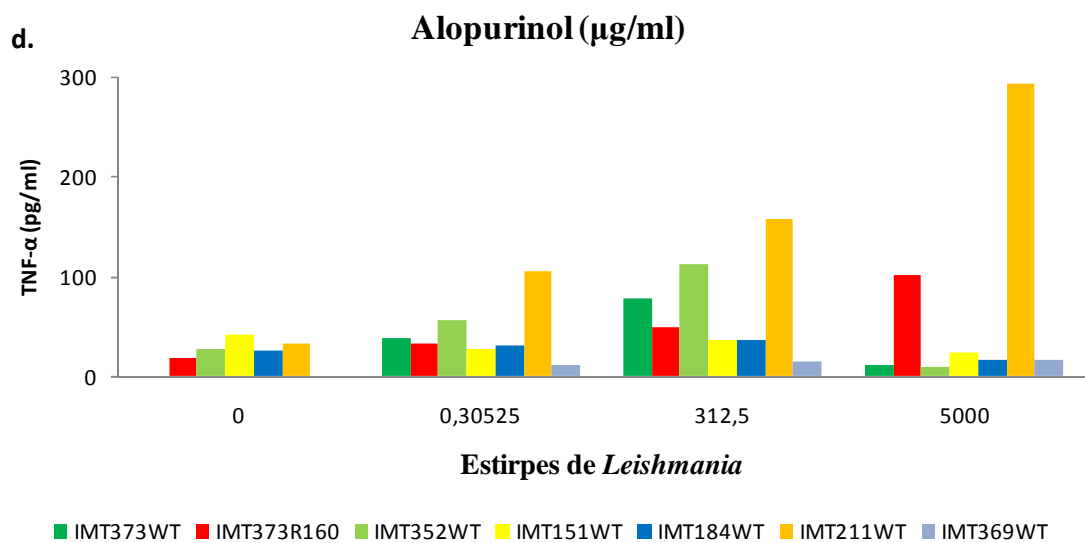
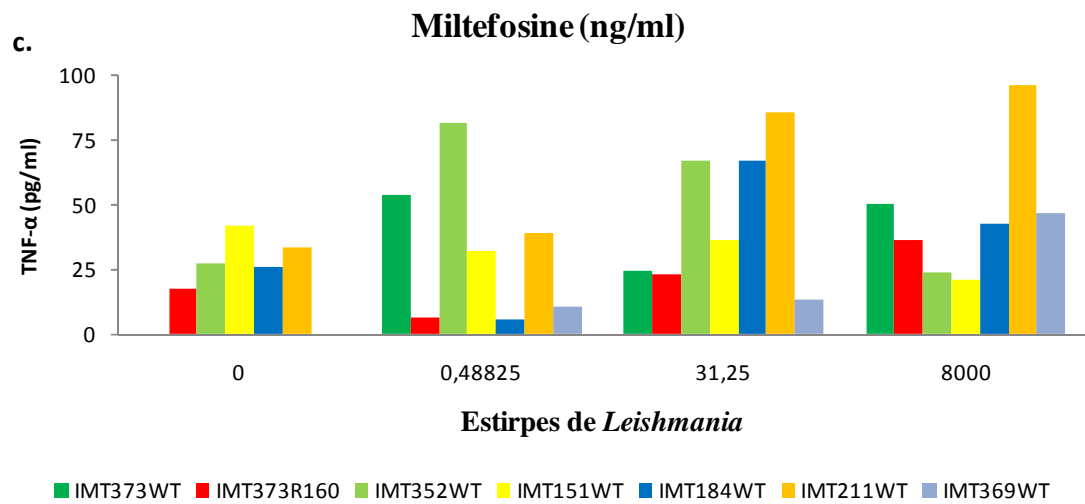
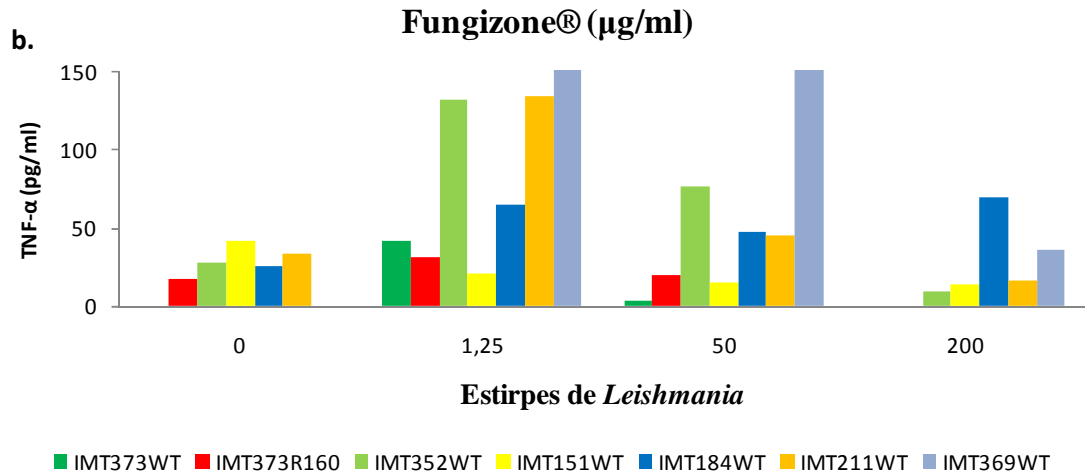


5.2.6.2. Produção de TNF- α

Não se observou uma relação na produção de TNF- α e o tratamento dos macrófagos infectados com os diferentes fármacos (Figura 5.9). Com exceção das células infectadas com a estirpe IMT211 tratadas com miltefosine e alopurinol, e com a estirpe IMT352 tratada com Glucantime® onde a produção da citocina foi aumentando com o aumento da dose de fármaco, nos macrófagos infectados com as outras estirpes, a produção de TNF- α foi oscilando com as diferentes concentrações dos fármacos.

Figura 5.9. Produção de TNF- α pelos macrófagos da linha U937 infectados com as estirpes selvagens de *Leishmania* e IMT373R16 e tratados com diluições seriadas de Glucantime® (a.), Fungizone® (b.), miltefosine (c.) e alopurinol (d.).





5.3. Discussão

A quimioterapia tratamento das leishmanioses, apoiada num número limitado de fármacos, é dificultada devido à variação de sensibilidade das diferentes espécies e estirpes de *Leishmania* aos fármacos, às multifacetadas manifestações da doença, à falta de ensaios clínicos de novos agentes terapêuticos e ao aparecimento de casos de resistência aos fármacos considerados de primeira linha. Factores a ter em conta são também a resposta imunitária do hospedeiro assim como a farmacocinética (Croft *et al.*, 2006).

A identificação e avaliação de novos produtos anti-*Leishmania* assim como a monitorização da eficácia dos fármacos existentes apresentam como principais problemas a dificuldade de como melhor determinar a viabilidade do parasita e como determinar *in vitro* o que se passa *in vivo*. qual a importância da variação de susceptibilidade de diferentes estirpes de *Leishmania* aos fármacos. O modelo *in vitro* para avaliação dos diferentes fármacos convencionais e de novas moléculas deve ser rápido, reprodutível, requerer pequenos volumes/quantidades dos compostos, ser economicamente exequível e apresentar correlação da sua acção *in vivo* (Croft & Yardley, 2002; Fumarola *et al.*, 2004; Sereno *et al.*, 2007).

Os quatro compostos estudados foram escolhidos por serem utilizados como fármacos de 1ª e 2ª linha no tratamento da leishmaniose visceral humana e/ou canina em Portugal. O Glucantime® foi, até há pouco tempo, o fármaco de 1ª linha no tratamento da LV humana tendo vindo a ser substituído pela anfotericina B, razão pela qual a acção do Fungizone® também foi analisada. O antimonial continua a ser o composto mais utilizado na terapêutica da leishmaniose canina. A escolha do miltefosine prendeu-se com o facto de ter sido introduzido recentemente, em 2007, no mercado português para o tratamento do hospedeiro canino. O alopurinol, é utilizado na terapêutica de 1ª linha da leishmaniose canina normalmente associado ao Glucantime® ou miltefosine.

A determinação das actividades da fosfatase ácida e da lactato desidrogenase deveu-se a estas enzimas estarem presentes unicamente na superfície interna da membrana ou no citoplasma dos promastigotas viáveis sendo libertadas para o meio quando estes são destruídos (Martin & Clynes, 1991). Apesar destas técnicas serem consideradas simples, não dispendiosas e reprodutíveis (Bodley *et al.*, 1995; Carrió *et al.*, 2000; Fumarola *et al.*, 2004), no nosso estudo a interferência da cor dos fármacos

Fungizone® (amarelo) e Alopurinol (branco) produziu um elevado “background” na leitura da absorvância. No caso da lactato desidrogenase verificou-se ainda uma reacção com o FCS usado no meio de cultura e crescimento dos promastigotas, pelo que a sua remoção impediria a sobrevivência dos parasitas.

A elevada variação inter-ensaio observada com o Picogreen® poderá dever-se à interferência de algumas moléculas presentes nos fármacos Miltefosine e Glucantime®, na intercalação do fluorocromo no DNA parasitário. Esta interferência foi observada por Corbett *et al.* (2004) ao utilizarem o Picogreen® para avaliar a inibição do crescimento de *Plasmodium falciparum* por diferentes fármacos.

A contagem microscópica será de difícil implementação como técnica de rotina para determinação da susceptibilidade de isolados clínicos devido à necessidade de determinar o número de parasitas viáveis em diluições seriadas dos fármacos, tornando-a muito trabalhosa e demorada (Fumarola *et al.*, 2004).

Neste estudo, verificou-se a reprodutibilidade da técnica XTT descrita por Williams *et al.* (2003) após testarem a susceptibilidade de *L. mexicana* a extractos de plantas pelo que se optou pela sua utilização nos nossos ensaios.

O sistema que utiliza as formas promastigotas para determinação da citotoxicidade aos diferentes fármacos tem como vantagens a facilidade de obtenção de grandes quantidades de parasitas e a rapidez de execução e leitura. Porém, o sistema amastigota-macrófago tem maior semelhança com o que se passa na infecção *in vivo*.

A percentagem de macrófagos, obtidos através dos monócitos do sangue periférico humano (PBM), infectados com as estirpes de *L. infantum* IMT151 e IMT373 foi de 55.0% e 62.0% respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos resultados obtidos por Berman *et al.* (1979) e Ogunkolade *et al.* (1990) ao utilizarem macrófagos provenientes de PBM humano, infectados com formas amastigotas de *Leishmania donovani* e promastigotas de *L. infantum*. Apesar destes macrófagos terem a vantagem de não se multiplicarem, quando utilizados em ensaios *in vitro* originam uma baixa prevalência de infecção com *Leishmania*. Uma outra desvantagem reside no facto que é bastante complicado obter uma quantidade suficiente destes macrófagos frescos, sendo um ensaio moroso (8 dias), onde só a diferenciação dos monócitos em macrófagos demora cerca de 6 dias. Por outro lado os ensaios realizados com a linha celular humana U937 e com os macrófagos peritoneais (IP) demoram apenas 5 dias.

Os modelos de macrófagos da linha celular canina DH82 e PBM foram estatisticamente menos permissivos à infecção por ambas as estirpes de *L.infantum* e demonstraram menor intensidade de infecção que os outros modelos de macrófagos utilizados, nomeadamente U937, IP e macrófagos derivados de células precursoras da medula óssea (BM). Tendo em conta os estudos publicados até à actualidade, esta parece ser a primeira vez que as células da linha celular canina DH82 foram utilizadas para estudar *in vitro* a permissividade aos parasitas.

A percentagem de infecção com *L.infantum* nos macrófagos IP foi de 69.0% com a estirpe IMT151 e de 72.0% com a estirpe IMT373. Adinolfi & Bonventre (1985) infectaram macrófagos IP com cinco amastigotas de *L. donovani* por célula, obtendo cerca de 90% de macrófagos infectados. Uma vez que foi utilizado o mesmo número de parasitas para infectar cada célula, as diferenças obtidas entre os resultados devem-se, provavelmente, à diferente capacidade de infecção entre as duas formas do ciclo de vida do parasita. No entanto a infecção com amastigotas implica a manutenção de um elevado número de animais de laboratório com leishmaniose.

Apesar da permissividade dos macrófagos do PBM e da BM à infecção com as 2 estirpes de *L.infantum* (76.0% para a IMT151 e 66.0% para a IMT373), estes dois modelos são pouco práticos devido à variedade de células presentes no lavado peritoneal assim como à quantidade de macrófagos necessários para os ensaios *in vitro*. Além do mais a manutenção de um elevado número de animais infectados torna-se bastante dispendiosa e levanta problemas éticos relacionados com o bem estar animal.

A linha U937 mostrou-se bastante susceptível à infecção por ambas as estirpes de *L.infantum* (70.0% para a IMT151 e 73.0% para a IMT373). Bosque *et al.* (1998) obtiveram resultados semelhantes ao infectarem cada célula U937 com 40 promastigotas de *L. panamensis*. Este resultado poderá estar relacionado com o tropismo das estirpes. Geralmente a infecção com estirpes cutâneas é confinada à pele, enquanto que as estirpes viscerais dispersam-se para todo o sistema mononuclear fagocitário invadindo os órgãos internos através dos monócitos do sangue periférico.

Para os quatro fármacos em estudo a dose máxima tolerada obtida pela linha celular humana U937 sugere que este é um bom modelo para ensaios *in vitro*, uma vez que esta linha celular é tolerante a altas concentrações de fármacos.

Em relação às estirpes de *L. infantum* utilizadas na infecção dos cinco tipos de macrófagos, verificou-se que ambas apresentaram um comportamento semelhante. A estirpe IMT151, isolada de um caso de leishmaniose visceral humana, exibiu a mesma capacidade de infectar tanto macrófagos humanos como macrófagos caninos. Em comparação com a estirpe humana, não foi observada qualquer preferência na infecção da linha celular canina com a estirpe canina IMT373. Os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Méndez *et al.* (1996) ao utilizarem quatro estirpes de *L. infantum*, duas isoladas de cães e duas isoladas de humanos, para infectar macrófagos peritoneais de BALB/c. Apesar do tipo de células ser diferente das por nós utilizadas, não observaram quaisquer diferenças na percentagem e intensidade de infecção entre as várias estirpes de *L. infantum*.

Após análise dos resultados, utilizou-se a linha celular U937 para prosseguir os ensaios com as seis estirpes de *Leishmania* em estudo.

Em ambos os sistemas as estirpes humanas IMT369 e IMT184 foram as que apresentaram o IC50 mais elevado para o Glucantime® reflectindo o que se passou *in vivo*; ambas as estirpes foram isoladas em casos de leishmaniose visceral humana em que o tratamento com antimoniais fracassou. A estirpe que necessitou menos fármaco para reduzir em 50% o número de parasitas viáveis foi a IMT151 isolada de um indivíduo imunocompetente que curou após terapia. Estes resultados são discordantes aos obtidos por Sharief *et al.* (2006), os quais não observaram diferenças na susceptibilidade dos promastigotas de *L. donovani* ao Pentostam® entre estirpes isoladas de indivíduos que responderam ao tratamento com este antimonial e os que foram refractários à terapêutica.

A estirpe IMT373 isolada de um cão sem tratamento foi a que apresentou o maior IC50 para o Glucantime®. Tendo em conta os resultados obtidos com a estirpe IMT373 no modelo animal (canino e roedor) assim como no vector, podemos concluir que esta se assemelha ao observado na Natureza, também as estirpes caninas isoladas de animais não tratados, responsáveis pela doença no animal, são pouco susceptíveis à acção do fármaco utilizado na 1ª linha do tratamento da leishmaniose canina. Apesar do cão a partir do qual se isolou esta estirpe não ter sido tratado, o seu IC50 para o Glucantime® foi superior à da isolada do indivíduo imunocompetente (no sistema promastigota e no sistema amastigota-macrófago), reforçando a ideia defendida por outros autores de que este fármaco não será o mais indicado para o tratamento da leishmaniose canina ao não eliminar por completo o parasita facilitando

desta forma o desenvolvimento de estirpes resistentes (Gramiccia *et al.*, 1992; Sereno *et al.*, 2001a; Carrió & Portús, 2002).

Piñero *et al.* (2002) compararam o IC50 para o Fungizone® em isolados obtidos antes e após o tratamento com Glucantime® e verificaram que a concentração de anfotericina B necessária para reduzir em 50% o número de parasitas viáveis foi superior nas recidivas concluindo haver um certo grau de resistência cruzada entre estes dois fármacos. Esta poderá ser a razão porque a estirpe IMT369, refractária ao tratamento com Glucantime® e com o maior IC50 para este fármaco, foi também a que necessitou de uma maior concentração de Fungizone® para reduzir em 50% os parasitas viáveis em ambos sistemas. Por outro lado, Durand *et al.* (1998) verificaram que as estirpes isoladas do mesmo doente imunodeprimido após tratamento com anfotericina B ficaram mais susceptíveis à sua acção concluindo que a a ineficácia do tratamento se deve à imunodepressão do sistema imunitário do hospedeiro e não à presença de parasitas resistentes. No nosso estudo, as duas estirpes isoladas do mesmo indivíduo imunodeprimido apresentaram um IC50 semelhante para o Fungizone®. A manutenção do IC50, mesmo após a estirpe IMT211 ter sido isolada durante o início do tratamento com Fungizone®, poderá ser explicada pela presença de *L. major*, que é menos susceptível à anfotericina B do que as estirpes viscerotrópicas (Escobar *et al.*, 2002).

A anfotericina B é raramente utilizada no tratamento da leishmaniose canina não havendo um elevado contacto das estirpes de *L. infantum* com o fármaco podendo ser essa a razão da estirpe IMT373 ter sido a que apresentou o menor IC50 para o Fungizone®. O facto da estirpe IMT352 apresentar o segundo maior IC50 poderá ser devido à selecção de parasitas ocorrida *in vivo* pelo tratamento do animal com alopurinol e levamisol.

Apesar do IC50 do miltefosine para as estirpes caninas serem menores do que para as humanas (excepto para os promastigotas da IMT184), deve-se evitar a sua utilização no tratamento da leishmaniose canina, de modo a prevenir o aparecimento de estirpes resistentes que possam ser transmitidas para o ser humano uma vez que, tal como acontece com o Glucantime®, este fármaco não leva à eliminação total da carga parasitária (Miró *et al.*, 2007b; Alvar *et al.*, 2008).

Apesar do alopurinol ser utilizado na 1ª linha de tratamento da leishmaniose canina, o elevado IC50 obtido para as estirpes caninas demonstra que este fármaco não deve ser utilizado como monoterapia, o que também é defendido por

Saridomichelakis *et al.* (2005) ao verificar que a administração periódica deste composto não evita o aparecimento de recidivas. Outros autores (Gradoni *et al.*, 1996; Ribera *et al.*, 1995; Croft *et al.*, 2006) verificaram que as recidivas também não foram evitadas em indivíduos imunodeprimidos com a utilização do alopurinol como profilaxia secundária. Neste estudo verificámos que as estirpes humanas tratadas com este fármaco apresentaram IC50 elevados.

A heterogeneidade observada tanto no sistema de promastigotas axénicos como no sistema amastigota-macrófago nas cinco estirpes analisadas aos quatro fármacos poderá estar relacionado com a sua origem. Neste estudo foram utilizadas estirpes isoladas de diferentes hospedeiros uma de um canídeo sem tratamento (IMT373) e as outras quatro isoladas de humanos, duas de indivíduos imunocompetentes (IMT151 e IMT369) e duas isoladas do mesmo indivíduo imunodeprimido, uma antes de ter sido efectuado tratamento (IMT184) e a outra após tratamento com Glucantime® e Fungizone® (IMT211).

Os modelos *in vitro* utilizados para o estudo da susceptibilidade aos fármacos anti-*Leishmania* são muito heterogêneos em relação às várias espécies de *Leishmania*, à forma parasitária (promastigotas, amastigotas axénicos e amastigotas intracelulares) e às condições de cultura utilizadas. Assim, os resultados obtidos podem diferir muito entre si dificultando a comparação e a correlação destes modelos com a resposta *in vivo* (Carrió & Portús, 2002). Apesar de Rijal *et al.* (2007) defenderem que a relação entre os fenótipos obtidos *in vitro* e a resposta clínica não ser muitas das vezes linear pondo em causa a existência hoje em dia algum sistema *in vitro* com valor prognóstico, vários autores (Bhattacharrya *et al.*, 2002; Dube *et al.*, 2005; Croft *et al.*, 2006) defendem a utilização do sistema amastigota-macrófago como melhor modelo de aproximação com a resposta clínica. No entanto, Carrió *et al.* (2001) observaram uma correlação entre os resultados obtidos através dos dois sistemas. Estes resultados são semelhantes aos observados com as estirpes IMT373, IMT184 e IMT369. A correlação positiva entre os IC50 obtidos com as duas formas do parasita assim como a associação observada com a resposta dos doentes ao tratamento nos permite concluir que, apesar de os modelos *in vitro* não serem totalmente eficazes a antever a resposta terapêutica, podem ser usados como um indicador da susceptibilidade da estirpe *in vivo* aos fármacos. Tendo em conta que não se observaram diferenças significativas entre os IC50 obtidos com ambos os sistemas, e sabendo da dificuldade laboriosa de utilizar o sistema amastigota-macrófago (Serenio

et al., 2007), é preferível usar o sistema de promastigotas axénicos como indicador da susceptibilidade dos isolados de *Leishmania* aos fármacos utilizados nas terapêuticas humana e canina.

A anfotericina B tem sido utilizada sobretudo após falha terapêutica com os antimoniais e em casos de co-infecção *Leishmania*/HIV, estes últimos ocorrendo principalmente no Sudoeste da Europa. Apesar de existirem poucos estudos acerca da emergência de resistência do parasita a este fármaco (Croft *et al.*, 2006), a possibilidade do aparecimento de estirpes resistentes não deve ser minimizada, tendo em conta que a percentagem de cura nos indivíduos imunodeprimidos varia entre os 58.0 e 82.0% com frequentes recaídas (Alvar *et al.*, 2008). Seleccionaram-se estirpes quimio-resistentes *in vitro* por exposição prolongada de promastigotas a doses crescentes de Fungizone®. A indução de resistência nas formas promastigotas deve-se à maior facilidade de ser obtida e analisada (Seifert *et al.*, 2007).

A adaptação inicial dos promastigotas à pressão do fármaco foi lenta, os parasitas necessitavam de cerca de um mês para se adaptarem ao meio com fármaco. A escolha da concentração 160ng/ml deveu-se ao facto de que a partir da concentração de 80ng/ml de Fungizone®, as estirpes cresciam a um ritmo rápido, sem que a pressão do fármaco afectasse a densidade parasitária. Cauchetier *et al.* (2002) observaram que os promastigotas de *L. infantum* resistentes à atovaquona apresentavam um ritmo de crescimento duas vezes mais rápido que a estirpe selvagem. Morfologicamente os parasitas R160 na fase estacionária do crescimento apresentaram uma forma mais ovalada do que os selvagens. Silva *et al.* (2004) e Al-Mohammed *et al.* (2005) também observaram que os promastigotas de *L. mexicana* resistentes à anfotericina B ou à glibenclamida apresentavam respectivamente inclusões lipídicas na bolsa flagelar e um maior comprimento e um maior volume.

Após indução da resistência ao Fungizone®, determinou-se o IC₅₀ dos promastigotas (estirpes R160) aos quatro fármacos e verificou-se que todas, excepto a IMT151R160, ficaram menos susceptíveis a este fármaco enquanto que relativamente ao Glucantime®, apenas as estirpes provenientes do doente imunodeprimido (IMT184R160 e IMT211R160) necessitaram uma maior concentração para reduzir em 50% os parasitas viáveis. A pressão do fármaco pode ter levado à selecção de parasitas com um menor poder de adaptação a situações de stresse (Natera *et al.*, 2007). As estirpes IMT184R160 e IMT373R160 mostraram menor susceptibilidade ao miltefosine. A resistência cruzada entre antimoniais, anfotericina B e miltefosine

foi também observada por Vergnes *et al.* (2007) em isolados de *L. donovani*. A diminuição da susceptibilidade das estirpes isoladas de indivíduos imunodeprimidos aos fármacos utilizados na 1ª linha de tratamento poderá facilitar a dispersão de parasitas multiresistentes. Os doentes co-infectados são uma fonte de parasitas quimio-resistentes devido a não responderem ao tratamento (Alvar *et al.*, 2008). A dispersão destas leishmanias é facilitada em indivíduos toxicodependentes de drogas endovenosas, havendo transmissão de parasitas através da partilha de agulhas (Croft *et al.*, 2006; Alvar *et al.*, 2008).

Os parasitas IMT373R160 foram utilizados para infectar a linha humana U937 verificando-se que estes parasitas mantêm a capacidade de infectarem *in vitro* os macrófagos. Mbongo *et al.* (1998) obtiveram o mesmo resultado quando infectaram macrófagos peritoneais de murganho com promastigotas de *L. donovani* resistentes à anfotericina B. A infecção das células U937 com a estirpe IMT373R160 demonstrou ainda que o fenótipo de resistência da forma promastigota é mantido na forma amastigota uma vez que estes parasitas foram menos susceptíveis a todos os fármacos. Seifert *et al.* (2007) obtiveram resultados semelhantes quando induziram resistência ao miltefosine em promastigotas de *L. donovani*. A necessidade de uma maior concentração de todos os fármacos para diminuir para metade o número de amastigotas viáveis da estirpe IMT373 tratada com anfotericina B reforça a ideia de que o tratamento do reservatório canino da leishmaniose visceral zoonótica não deve ser efectuado com os mesmos compostos que o ser humano de modo a evitar o aparecimento e consequente transmissão de parasitas resistentes ao Homem.

Sabe-se que os promastigotas resistentes à anfotericina B apresentam alterações na composição química da sua membrana (Al-Mohammed *et al.*, 2005). Neste estudo a alteração da membrana parece ter permitido que esta ficasse mais permeável à entrada do alopurinol pois todas as estirpes R160 ficaram mais susceptíveis à sua actividade enquanto que para os outros fármacos parece ter interferido com o seu mecanismo de acção, afectando a sua eficácia.

As sequências do gene *mdr* de cada estirpe na sua forma selvagem (WT) e tratada com 160ng/ml de AMB (R160) foram alinhadas de modo a serem comparadas. Pela análise foram encontradas alterações pontuais entre as sequências das amostras das estirpes selvagens e resistentes. Alterações na sequência do *mdr* podem levar à formação de diferentes aminoácidos, podendo originar uma proteína diferente ou menos funcional, sugerindo que a sua função possa ser alterada. De

facto, Chow & Volkman (1998) sugerem que mutações no gene *mdr* podem resultar no aumento de resistência ao fármaco. Um estudo semelhante ao aqui descrito foi desenvolvido por Henderson *et al.* (1992) com *L. donovani*, em que os autores observaram que a amplificação do gene *mdr* revelava de *L. donovani* de resistência cruzada a vários fármacos. Singh *et al.* (2001) também observaram alterações neste gene em *L. tarentolae* resistente à AMB.

A mutação presente nas formas em que foi induzida resistência à anfotericina, deu origem ao mesmo aminoácido presente na IMT352WT, isolada do cão sujeito a tratamento com alopurinol, sugerindo, tal como por nós observado no sistema de promastigotas axénicos, uma possível associação entre a resistência à AMB e uma maior susceptibilidade à acção deste fármaco.

Para verificar se a resistência induzida era estável determinou-se o IC₅₀ das estirpes IMT151S e IMT373S quatro semanas após a remoção da pressão do Fungizone®. No caso da estirpe isolada do indivíduo imunocompetente o fenótipo de resistência ao Fungizone® foi mantido. A manutenção do fenótipo ao fármaco ao qual se induziu resistência também observado por Cauchetier *et al.* (2002), Bories *et al.* (2008) e Seifert *et al.* (2007) utilizando *L. infantum* e atovaquona, *L. donovani* e sitamaquina ou *L. donovani* e miltefosine. Contudo, a estirpe canina IMT373S perdeu o fenótipo de resistência em relação ao miltefosine, alopurinol e Fungizone®. A perda da resistência após remoção da pressão do fármaco pode ser devida a um fenótipo de resistência instável ou à redistribuição entre os clones sensíveis e resistentes da população parasitária (Serenio & Lemesre, 1997). Segundo Agnew *et al.* (2001) a perda do fenótipo de resistência por interacção entre clones sensíveis e resistentes leva à rápida substituição da estirpe resistente, limitando a sua manutenção e persistência. Os resultados obtidos na infecção experimental de murganhos com a estirpe IMT373R160 demonstraram que, no dia 56 após inoculação, todos os animais estavam infectados, enquanto que no grupo IMT373 apenas em 50% dos animais se detectaram parasitas.

A apoptose ou morte celular programada (MCP) é um processo regulado bioquimicamente, normalmente induzido quando a célula é danificada, sujeita a uma situação de stresse ou quando começa a proliferar de uma forma descontrolada. A apoptose em infecções por *Leishmania*, para além de permitir que o parasita controle o seu número no interior da célula hospedeira, de modo a evitar a indução de uma

resposta imune, pode ocorrer como resposta aos compostos anti-*Leishmania* (Lee *et al.*, 2002; Verma & Dey, 2004; Shaha, 2006).

Em nenhuma das estirpes estudadas houve eliminação total dos parasitas, mesmo com as concentrações mais elevadas dos diferentes fármacos.

A MCP por acção dos antimonias foi verificada em promastigotas de *L. donovani* (Lee *et al.*, 2002) e amastigotas axénicos de *L. infantum* (Serenio *et al.*, 2001b). Resultados semelhantes foram obtidos por Sudhandiran & Shaha (2003) e Holzmüller *et al.* (2002) em amastigotas intracelulares onde estes compostos levaram à fragmentação do DNA parasitário. No nosso estudo apenas a estirpe IMT184 e IMT373R160 apresentaram um maior número de parasitas apoptóticos na concentração mais elevada de Glucantime®. As estirpes IMT184, IMT373 e IMT373R160 apresentaram um maior número de parasitas em apoptose na concentração mais elevada de Fungizone® e as estirpes IMT373 e IMT373R160 com o miltefosine. Com o alopurinol apenas a estirpe IMT373R160 apresentou um elevado número de leishmanias apoptóticas.

Das nossas observações pode-se concluir que, embora a estirpe IMT373R160 tenha apresentado um elevado número de amastigotas apoptóticos na presença de todos os fármacos, a apoptose não parece ser o principal mecanismo pelo qual os parasitas sobrevivem em contacto com os compostos. Estes resultados são discordantes aos obtidos por Vergnes *et al.* (2007) em que a estirpe de *L. donovani* resistente aos antimonias apresentava um menor número de parasitas em apoptose na presença de anfotericina B e miltefosine. A diferença pode residir na resistência ter sido por induzida *in vitro* e também por se ter utilizado Fungizone® e não antimonias.

O padrão da produção de citocinas pode influenciar a susceptibilidade ou resistência à doença. O TNF- α desempenha um papel importante no controlo da infecção, ao agir sinergisticamente com o IFN- γ na activação dos macrófagos para a produção da enzima iNOS e consequente destruição do parasita (Liew *et al.*, 1990; Bogdan *et al.*, 1990a). A produção de TNF- α encontra-se reduzida em macrófagos infectados, em comparação com células não infectadas (Reiner, 1987; Descoteaux & Matlashewski, 1989; Carrera *et al.*, 1996). Contrariamente, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β parecem contribuir para o estabelecimento da infecção. Macrófagos infectados por *Leishmania* tendem a aumentar a produção daquelas

citocinas, conduzindo a uma diminuição da sua capacidade leishmanicida (Barral *et al.*, 1993; Bogdan & Nathan, 1993; Stenger *et al.*, 1994).

Neste trabalho, a produção de IL-10 pelos macrófagos infectados com as estirpes de *Leishmania* estudadas foi superior nas células infectadas não tratadas. A produção desta citocina foi diminuindo à medida que as células eram tratadas com concentrações mais elevadas de fármaco. A estirpe IMT369 foi a única cujo aumento da concentração de miltefosine não foi acompanhado por uma redução expressiva da produção desta citocina.

Com excepção das estirpes IMT373 e IMT151, a maior concentração de Glucantime® foi acompanhada pela maior produção de TNF- α , o que está de acordo com o observado por Jha (2006) de que a acção dos antimoniais depende da resposta Th1 do hospedeiro. Apesar de vários autores (Tokuda *et al.*, 1993; Mozaffarian *et al.*, 1997; Vonk *et al.*, 1998; Kolodziej *et al.*, 2001) terem concluído que a anfotericina B leva ao aumento da produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com diferentes microrganismos, neste estudo, o mesmo não foi observado de um modo expressivo com o aumento da concentração de Fungizone®. Uma das razões poderá ser a verificada por Rogers *et al.* (1998), de que o pico de expressão de TNF- α é 4 horas após contacto com a anfotericina B e os nossos sobrenadantes só terem sido recolhidos 24 horas após tratamento das células com os diferentes fármacos.

A terapia combinada com agentes que aumentem a resposta celular Th1 e/ou que estimulem directamente a acção dos macrófagos ou com compostos que neutralizem ou bloqueiem os seus mecanismos supressores poderão ser estratégias a utilizar futuramente de modo a aumentar a eficácia do tratamento com controlo da infecção (Murray, 2001; Jha, 2006). De modo a verificar se a acção sinérgica de imunoestimuladores/imunoinibidores com os compostos utilizados no tratamento da leishmaniose incrementaria a sua eficácia, Rijal *et al.* (2007) defendem que os sistemas *in vitro* devem ser ajustados de modo a incluir algumas citocinas que mimetizem a acção do sistema imunitário.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

6. Conclusões

No presente estudo caracterizou-se a infecção experimental do modelo canino concluindo-se que, a inoculação por via endovenosa de formas amastigotas de *Leishmania infantum* permite o estabelecimento rápido e consistente da infecção, sendo o modelo ideal para o estudo da patogénese, assim como para a avaliação de novos produtos terapêuticos e imunoprolifáticos. Para a avaliação de moléculas candidatas a (imuno)terapia a determinação de anticorpos específicos assim como a detecção do parasita por técnicas moleculares são parâmetros eficazes para identificar a infecção e acompanhar a evolução. Apesar do baço se revelar o órgão mais infectado, a biópsia aspirativa do gânglio ou da medula óssea são amostras alternativas eficazes e menos invasivas. Através da análise da resposta imunitária verificou-se que a resposta mista Th1/Treg permite que os animais não apresentem sinais evidentes, embora não seja suficiente para a completa eliminação do parasita. Embora não se tenham observado, de um modo geral, sinais clínicos dermatológicos a detecção de leishmanias na pele demonstrou a importância dos cães assintomáticos na potencial transmissão do parasita.

A infecção experimental do modelo murino através da co-inoculação de saliva do vector *Phlebotomus perniciosus* com estirpes de *L. infantum* selvagem ou tratada com anfotericina B permitiu concluir que a inoculação por via intradérmica permitiu a visceralização da infecção, aproximando-se ao que ocorre na Natureza, e que a saliva, foi responsável por antecipar a disseminação dos parasitas para os órgãos internos, embora não tenha correspondido a uma maior gravidade da infecção. Tendo em conta que a resposta imunitária celular foi estabelecida localmente para cada órgão em interacção com o parasita, pode-se concluir que a avaliação da resposta imunitária deverá ser determinada nos diferentes tecidos, e que não existe apenas um órgão com valor prognóstico da infecção. Os resultados sugeriram que a expressão da citocina pro-inflamatória TNF- α parece estar associada com a activação dos macrófagos e consequente controlo da multiplicação dos parasitas nos diferentes tecidos. Segundo o nosso conhecimento este foi o primeiro estudo em que parasitas de *L. infantum*

tratados com AMB conseguiram infectar e visceralizar no modelo murino. A presença dos parasitas na pele permite equacionar a possibilidade de na Natureza ocorrer selecção de isolados resistentes ao fármaco e a sua transmissão.

Através da infecção experimental de *P. perniciosus* e *L. longipalpis* com promastigotas de *L. infantum* tratados ou não com anfotericina B verificou-se que os parasitas tratados têm um desenvolvimento mais lento e uma menor capacidade de colonizarem o vector apontando para uma menor probabilidade de estirpes resistentes a este fármaco serem transmitidas na Natureza. Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento com AMB constituirá uma medida favorável à prevenção e controlo da transmissão da infecção através do bloqueio do ciclo de vida do parasita.

Outro dos objectivos deste estudo foi optimizar um modelo *in vitro* para testar a susceptibilidade de estirpes de *Leishmania* aos fármacos mais utilizados na terapêutica humana e canina (Glucantime®, Fungizone®, Miltefosine e Alopurinol). Através do estudo de permissividade dos cinco diferentes tipos de macrófagos à infecção pelas estirpes de *L. infantum* canina e humana analisadas, concluiu-se que a linha celular humana U937, os macrófagos peritoneais de Balb/c e os macrófagos derivados da medula óssea desta estirpe de murganhos foram os mais susceptíveis à infecção. Contudo, a linha celular U937 ao ser de obtenção menos morosa e dispendiosa que os outros tipos de macrófagos foi a escolhida para analisar *in vitro* a susceptibilidade das formas amastigotas de *Leishmania* aos fármacos em estudo. Desta forma evita-se também o sacrifício de um elevado número de animais assim como problemas de ordem ética relacionados com o bem estar animal. Após optimização dos dois sistemas (amastigota-macrófago e promastigotas axénicos), determinou-se a susceptibilidade das estirpes de *Leishmania* em estudo aos diferentes compostos terapêuticos. Por comparação dos resultados obtidos com ambos os sistemas verificou-se não haver diferenças significativas entre eles, pelo que a utilização do sistema de promastigotas axénicos poderá ser uma boa escolha devido a ser mais rápido e menos moroso.

A heterogeneidade observada nos IC50 das cinco estirpes analisadas, em relação aos quatro fármacos, poderá estar relacionado com as características intrínsecas de cada estirpe. Contudo, tendo em conta os resultados obtidos pode-se concluir que (i) as estirpes caninas isoladas de animais não tratados são pouco susceptíveis à acção dos antimoniais reforçando a ideia de que este fármaco não será o mais indicado para o tratamento da leishmaniose canina ao não eliminar por completo o parasita facilitando o aparecimento de estirpes resistentes e (ii) a diminuição da susceptibilidade das estirpes isoladas de indivíduos imunodeprimidos aos fármacos utilizados na 1ª linha de tratamento poderá facilitar a dispersão de parasitas multiresistentes.

Apesar de não ter havido eliminação total dos parasitas, a produção da IL-10 foi menor nas células tratadas mostrando que os compostos conseguem suprimir a produção desta citocina inibidora da activação dos macrófagos pelo que a imunoterapia com compostos que neutralizem ou bloqueiem os mecanismos supressores da acção dos macrófagos poderá ser uma estratégia a utilizar futuramente de modo a aumentar a eficácia do tratamento.

A selecção de estirpes quimio-resistentes *in vitro* interferiu com a susceptibilidade do parasita à acção dos fármacos, verificando-se uma menor eficácia dos compostos. A única excepção foi o Alopurinol. A alteração da membrana permitiu que esta ficasse mais permeável à entrada deste fármaco. A verificação da existência de resistência cruzada entre os fármacos utilizados na 1ª linha de tratamento reforça a necessidade de se testarem combinações terapêuticas e de se desenvolverem novas moléculas anti-*Leishmania*.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

- Abbas A., Murphy K., Sher A.** 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**: 787-79.
- Abranches P., Santos-Gomes G., Campino L.** 1993. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **70**: 349-355.
- Abranches P.** 1984. O kala-azar da área metropolitana de Lisboa e da região de Alcácer-do-Sal. Estudos sobre reservatórios doméstico e silvático e sobre a população humana em risco de infecção. *Tese*. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 226 pp.
- Abranches P.** 1989. Reservoirs of visceral leishmaniasis. In: *Leishmaniasis. The current Status and New Strategies for Control*. Hart, D. T. (Ed.), Plenum Press, New York, London, pp. 61-69.
- Abranches P., Campino L., Santos-Gomes G.** 1998. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controlo da leishmaniose visceral humana. *Acta Médica Portuguesa*, **11**: 871-875.
- Abranches P., Conceição-Silva F., Silva-Pereira M.** 1984. Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**: 197-200.
- Abranches P., Conceição-Silva F., Silva-Pereira M.** 1986. La leishmaniose viscérale dans la région de Lisbonne. Identification enzymatique. Interprétation structurale du foyer. In: *Leishmania Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-épidémiologiques*, J-A. Rioux (Ed.), IMEEE, Montpellier, pp. 427-432.
- Abranches P., Lopes F., Silva F., Ribeiro M., Pires C.** 1983. Le kala-azar au Portugal. III. Résultats d'une enquête sur la leishmaniose canine réalisée dans les environs de Lisbonne. Comparaison des zones urbaines et rurales. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **58**: 307-315.
- Abranches P., Pires C.** 1980. O Kala-Azar em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **3**: 203-207.
- Abranches P., Pires C., Conceição-Silva F., Silva-Pereira M., Gomes G.** 1987. O kala-azar em Portugal. VI. Inquérito epidemiológico realizado na Região Metropolitana de Lisboa: Interpretação da estrutura e dinâmica do foco endêmico. *Jornal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa*, **151**: 364-379.
- Abranches P., Sampaio-Silva M., Santos-Gomes G., Avelino I., Pires C., Conceição-Silva F., Seixas-Lopes A., Silva-Pereira M., Janz J.** 1992. Kala-azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijó (endemic region of Alto-Douro). *Research and Reviews in Parasitology*, **52**: 121-124.
- Abranches P., Santos-Gomes G., Rachamim N., Campino L., Schnur L., Jaffe C.** 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **13**: 537-550.

- Adinolfi I., Bonventre P.** 1985. Enhancement of glucantime® therapy of murine *Leishmania donovani* infection by a synthetic immunopotentiating compound (cp-46,665-1). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34**: 270-277.
- Afonso M., Campino L., Cortes S., Alves-Pires C.** 2005. The Phlebotomine sand flies of Portugal- XIII. Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrábida leishmaniasis focus. *Parasite*, **12**: 69-72.
- Aga E., Katschinski D., Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller K., Solbach W., Laskay T.** 2002 Jul. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology*, **169**: 898-905.
- Agnew P., Holzmüller P., Michalakakis Y., Sereno D., Lemesre J., Renaud F.** 2001. *In vitro* growth of *Leishmania amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine is dependent on interactions among strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1928-1929.
- Aguiar S.** 1970. Botão do Oriente em Portugal. *Gazeta Sanitária*, **19**: 193-195.
- Aguilar C., Rangel E., Grimaldi G., Momem H.** 1987. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **82**: 143.
- Agut A., Corzo N., Murciano J., Laredo F., Soler M.** 2003. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Record*, **153**: 648-652.
- Ahmed S., Colmenares M., Soong L., Goldsmith-Pestana K., Munstermann L., Molina R., McMahon-Pratt D.** 2003. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **71**: 401-410.
- Alexander J., Carter K., Al-Fasi N., Satoskar A., Brombacher F.** 2000. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, **30**: 2935-2943.
- Alexandre-Pires G., Pais D., Correia M., Pina J.** 2006. Leishmaniosis. a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microscopy Research and Technique*, **69**: 227-235.
- Aliaga L., Cobo F., Mediavilla J., Bravo J., Osuna A., Amador J., Matin-Sanchez J., Cordero E., Navarro J.** 2003. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicina*, **82**: 147-158.
- Almeida M., Cardoso S., Barral-Netto M.** 2003. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *International Journal for Parasitology*, **33**: 153-162.
- Al-Mohammed H., Chance M., Bates P.** 2005. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 3274-3280.
- Altet L., Francino O., Solano-Gallego L., Renier C., Sanchez A.** 2002. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infection and Immunity*, **70**: 2763-2771.

- Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Boer M., Cañavate C., Dedet J., Gradoni L., Horst R., López-Vélez R., Moreno J.** 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**: 334-359.
- Alvar J., Ballesteros J., Soler R., Benito A., Van Eys G., Schoone G., Cabrer B.** 1990. Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: biochemical characterization. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**: 614-618.
- Alvar J., Cañavete C., Molina R., Moreno J., Nieto J.** 2004. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, **57**: 1-88.
- Alvar J., Jimenez M.** 1994. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS*, **8**: 854.
- Alvar J., Molina R., San Andrés M., Tesouro M., Nieto J., Vitutia M., González F., San Andrés M. D., Boggio J., Rodríguez f., Sáinz A., Escacena C.** 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **88**: 371-378.
- Alvar J., Yactayo S., Bern C.** 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, **22**: 552-557.
- Alvares D.** 1910. Um caso de kala-azar infantil em Lisboa. *Medicina Contemporânea*, **13**: 90-91.
- Alvares D., Silva E.** 1911. Sobre a frequência do kala-azar nos cães em Lisboa. *Medicina Contemporânea*, **14**: 97.
- Alzate J., Arias A., Mollinedo F., Rico E., Iglesia-Vicente J., Jiménez-Ruiz A.** 2008. Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Ambroise-Thomas P.** 1976. Immunofluorescence in the diagnosis, therapeutic follow-up and sero-epidemiological studies of some parasitic diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**: 107-112.
- Andrade B., Oliveira C., Brodskyn C., Barral A., Barral-Neto M.** 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scandinavian Journal of Immunology*, **66**: 122-127.
- Andrade H., Toledo V., Mayrink W., Genaro O.** 1999. Evaluation of the immune response and production of interferon in canine visceral leishmaniasis. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **150**: 809-814.
- Anjili C., Githure J.** 1993. Refractoriness of domestic cats to infection with a Kenyan strain of *Leishmania donovani*. *East African Medical Journal*, **70**: 322.
- Antoine J., Jouanne C., Lang T., Prina E., De Chastellier C., Frehel C.** 1991. Localization of Major Histocompatibility Complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, **59**: 764-775.
- Ascher F., Pires C., Capela M., Aguiar P.** 1997. Effect protecteur d'un spray insecticide contre *Phlebotomus perniciosus* vecteur de leishmaniose. *Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisées en Petits Animaux*. C.N.V.S.P.A., 22 Novembro, Paris.

- Ashford D., David J., Freire M., David R., Sherlock I., Eulálio M., Sampaio D., Badaró R.** 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 53-57.
- Ashford R.** 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1269-1281.
- Ashford R., Bettini S.** 1987. Ecology and epidemiology: Old World. In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol. 1, *Biology and Epidemiology*. Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), Academic Press, New York, London, pp. 365-424.
- Ashford R., Desjeux P., deRaadt P.** 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, **8**: 104-105.
- Attar Z., Chance M., el-Safi S., Carney J., Azazy A., El-Hadi M., Dourado C. Hommel M.** 2001. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, **78**: 11-16.
- Azevedo J.** 1960. Sobre o diagnóstico do kala-azar. *Jornal do Médico*, **43**: 265-272.
- Azevedo J., Neves V.** 1963. La leishmaniose canine à Lisbonne. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **38**: 741-755.
- Azevedo J., Teixeira A.** 1947. Sobre a infestação por leishmanias nos cães de Lisboa. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, **4**: 99-106.
- Badaró R., Benson D., Eulálio M., Freire M., Cunha S., Netto E., Pedral-Sampaio D., Madureira C., Burns J., Houghton R., David J., Reed S.** 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, **173**: 758-761.
- Baleeiro C., Paranhos-Silva M., Santos J., Oliveira G., Nascimento E., Carvalho L., Santos W.** 2006. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. *Veterinary Parasitology*, **139**: 21-28.
- Baneth G., Koutinas A., Laia Solano-Gallego L., Bourdeau P., Ferrer L.** 2008. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, **24**: 324-330.
- Baneth G., Shaw S.** 2002. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, **106**: 315-324.
- Baneth, G., Aroch I.** 2008. Canine leishmaniasis. A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, **175**: 14-15.
- Barbier D., Demenais F., Lefait J., David B., Blanc M., Hors J., Feingold N.** 1987. Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Km markers. *Tissue Antigens*, **30**: 63-67.
- Barbiéri C.** 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **28**: 329-337.

- Barbosa W., Pinheiro Z., Oliveira R.** 1973. Electroimunodifusão no diagnóstico do calazar com os antígenos de *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis* e *Leptomonas pessoai*. Resultados preliminares. *Revista de Patologia Tropical*, **4**: 377-386.
- Barker D.** 1987. DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, **3**: 177-184.
- Barker D.** 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*, **99**: 125-146.
- Barnes J., Stanley O., Craig T.** 1993. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *Journal of the American Medical Association*, **202**: 416-418.
- Barral A., Barral-Netto M., Yong E., Brownell C., Twardzik D., Reed, S.** 1993. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**: 3442-3446.
- Barrouin-Melo S., Larangeira D., Filho F., Trigo J., Julião F., Franke C., Aguiar P., Santos W., Pontes-de-Carvalho L.** 2005. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *The Veterinary Journal*, **171**: 331-339.
- Barrouin-Melo S., Larangeira D., Trigo J., Aguiar P., Santos W., Pontes-de-Carvalho L.** 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**: 195-197.
- Barton C., Whitehead S., Blackwell J.** 1995. *Nramp* transfection transfers *Lsh/Ity/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Molecular Medicine*, **1**: 267-279.
- Basselin M., Denise H., Coombs G., Barrett M.** 2002. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 3731-3738.
- Bates P.** 1994. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, **79**: 215-218.
- Bates P.** 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, **37**: 1097-1106.
- Beck A., Beck R., Kusak J., Gudan A., Martinkovic F., Artukovic B., Hohsteter M., Huber D., Marinculic A., Grabarevic Z.** 2008. A case of visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*, **44**: 451-456.
- Belazzoug S., Lanotte G., Maazoun R., Pratlong F., Rioux J.** 1985. A new enzymatic variant of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent of cutaneous leishmaniasis in northern Algeria. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **60**: 1-3.
- Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Ribeiro J., Sacks D.** 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine*, **188**: 1941-1953.
- Belkaid Y., Mendez S., Lira R., Kadambi N., Milon G., Sacks D.** 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the

skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology*, **165**: 969-977.

Belkaid Y., Piccirillo C., Mendez S., Shevach E., Sacks D. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, **420**: 502-507.

Bell A., Ranford-Cartwright L. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology*, **18**: 337-342.

Benderitter T., Casanova P., Nashkidachvili L., Quilici M. 1988. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **82**: 335-341.

Benikhlef R., Pratlong F., Harrat Z., Seridi N., Bendali-Braham S., Belkaid M., Dedet J. 2001. Infantile visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* zymodeme MON-24 in Algeria. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **94**: 14-16.

Berhe N., Hailu A., Gemetchu T. 1995. Human immunodeficiency virus and recurrence of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania aethiopica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 400-401.

Berman J. Dwyer D., Wyler D. 1979. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *in vitro*. *Infection and Immunity*, **26**: 375-379.

Bertho A., Santiago M., Da-Cruz A., Coutinho S. 2000. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**: 317-325.

Bettini S., Gradoni L. 1986. Canine leishmaniasis in the mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Science and its Applications*, **7**: 241-245.

Bettini S., Gramiccia M., Gradoni L., Biggio P., Loi R., Cottoni F., Pau M., Atzeni M. 1990. Leishmaniasis in Sardinia. IV. Epidemiological appraisal of cutaneous leishmaniasis and biochemical characterization of isolates. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**: 262-269.

Bettini S., Pozio E., Gradoni L. 1980. Leishmaniasis in Tuscany (Italy) (II): *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**: 77-83.

Bhattacharya G., Salem M., Werbovetz K. 2002 Antileishmanial dinitroaniline sulfonamides with activity against parasite tubulin. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, **12**: 2395-2398.

Bhattacharya S., Jha T., Sundar S., Thakur C., Engel J., Sindermann H., Junge K., Karbwang J., Bryceson A., Berman J. 2004. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clinical of Infectious Diseases*, **38**: 217-221.

Binhazim A., Chapman W., Shin S., Hanson W. 1993. Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **54**: 113-121.

Blackburn K., Wallbanks K., Molyneux D., Lavin D., Winstanley S. 1988. The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **82**: 613-619.

- Blackwell J.** 1985. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunology Letters*, **11**: 227-232.
- Blackwell J.** 1989. The macrophage resistance gene *Lsh/Ity/Bcg*. *Research in Immunology*, **140**: 767-828.
- Blackwell J.** 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology*, **112**: 67-74.
- Blackwell J., Barton C., White J., Roach T., Shaw M., Whitehead S., Mock B., Searle S., Williams H., Baker A.** 1994. Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the *Lsh/Ity/Bcg* gene story continues. *Immunology Letters*, **43**: 99-107.
- Blackwell J., Mohamed H., Ibrahim M.** 2004. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends in Parasitology*, **20**: 268-274.
- Blank C., Bogdan C., Bauer C., Erb K., Moll H.** 1996. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Immunology*, **26**: 792-796.
- Blavier A., Keroack S., Denerolle P., Goy-Thollot I., Chabanne L., Cadoré J., Bourdoiseau G.** 2001. Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, **162**: 108-120.
- Bodley A., McGarry M., Shapiro T.** 1995. Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *Journal of Infectious Diseases*, **172**: 1157-1159.
- Boelaert M., Rijal S., Regmi S., Singh R., Karki B., Jacquet D., Chappuis F., Campino L., Desjeux P., Le Ray D., Koirala S., Van der Stuyft P.** 2004. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**: 72-77.
- Bogdan C.** 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, **2**: 907-916.
- Bogdan C., Donhauser N., Döring R., Röllinghoff M., Diefenbach A., Rittig M.** 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *Journal of Experimental Medicine*, **191**: 2121-2130.
- Bogdan C., Moll H., Solbach W., Röllinghoff M.** 1990a. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *European Journal of Immunology*, **20**: 1131-1135.
- Bogdan C., Nathan C.** 1993. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **685**: 713-739.
- Bogdan C., Röllinghoff M.** 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, **28**: 121-134.
- Bogdan C., Röllinghoff M.** 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today*, **15**: 22-28.
- Bogdan C., Röllinghoff M., Solbach W.** 1990b. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitology Today*, **6**: 183-187.

- Bonfante-Garrido R., Urdaneta I., Urdaneta R., Alvarado J.** 1991. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 53.
- Bonfante-Garrido R., Valdilva O., Torrealba J., Garcia M., Garofa M., Urdaneta I., Urdaneta R., Alvarado J., Copulillo E., Momen H., Grimaldi G.** 1996. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *venezuelensis*. *Revista Científica – Facultad de Ciencias Veterinarias*, **6**: 187-190.
- Bories C., Coffin C., Mathieu D., Bories P., Scherman E., Rivollet D., Deniau M.** 1998. Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **92**: 685-692.
- Bories C., Cojean S., Huteau F., Loiseau P.** 2008. Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **62**: 164-167.
- Borja-Cabrera G., Borja-Cabrera G., Mendes A., Souza E., Okada L., Trivellato F., Kawasaki J., Costa A., Reis A., Genaro O., Batista L., Palatnik M., Palatnik-de-Sousa C.** 2004. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, **22**: 2234-2243.
- Borja-Cabrera G., Pontes N., Silva V., Souza E., Santos W., Gomes E., Luz K., Palatnik M., Palatnik-de-Sousa C.** 2002. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quila saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, **20**: 3277-3284.
- Bosque F., Milon G., Valderrama L., Saraiva N.** 1998. Permissiveness of human monocytes and monocyte derived macrophages to infection by promastigotes of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*. *Journal of Parasitology*, **84**: 1250-1256.
- Bossolasco S., Gaiera G., Olchini D., Gulletta M., Martello L., Bestetti A., Bossi L., Germagnoli L., Lazzarin A., Uberti-Foppa C., Cinque, P.** 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 5080-5084.
- Bourdoiseau G., Bonnefont C., Hoareau E., Boehringer C., Stolle T., Chabanne L.** 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **59**: 21-30.
- Bourré P., Venencie P., Vieillefond A., Fries D., Rioux J., Pratlong F.** 1990. Leishmaniasis in patients with renal transplantation. *Bulletin de La Société Française de Parasitologie*, **92**: 418.
- Bourreau E., Prevot G., Pradinaud R., Launois P.** 2001. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *Journal of Infectious Diseases*, **183**: 953-959.
- Bozza M., Fernandes O., Degraive W., Lopes U.** 1995. Characterization of 'Old World' *Leishmania* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 333-334.

- Brachelente C., Müller N., Doherr M., Sattler U., Welle M.** 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Veterinary Pathology*, **42**: 166-175.
- Bray. R.** 1982. The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. *Ecology of Disease*, **1**: 257-267.
- Bray R.** 1983. *Leishmania*: chemotaxic responses of promastigotes and macrophages *in vitro*. *Journal of Protozoology*, **30**: 322-329.
- Bretagne S., Durand R., Olivi M., Garin J., Sulahian A., Rivollet D., Vidaud M., Deniau M.** 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**: 828-831.
- Brittingham A., Morrison C., McMaster W., McGwire B., Chang K., Mosser D.** 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology*, **155**: 3102-3111.
- Brittingham A., Mosser D.** 1996. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology Today*, **12**: 444-447.
- Bryceson A.** 1996. Leishmaniasis. In "Manson's Tropical Diseases" (20th ed.). G. C. Cook (Ed.). W. B. Saunders Company, Ltd., London. 1755 pp.
- Buates S., Matlashewski G.** 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *Journal of Immunology*, **166**: 3416-342.
- Bucheton B., Abel L., Kheir M., Mirgani A., El-Safi S., Chevillard C., Dessein A.** 2003. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMPI region. *Genes and Immunity*, **4**: 104-109.
- Bunn-Moreno M., Madeira E., Miller K., Menezes J., Campos-Neto A.** 1985. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. *Clinical and Experimental Immunology*, **59**: 427-434.
- Buracco P., Abate O., Guglielmino R., Morello E.** 1997. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, **38**: 9-30.
- Burchmore R., Barrett M.** 2001. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1311-1320.
- Burns J., Shreffler W., Benson D., Ghalib H., Badaró R., Reed S.** 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**: 775-779.
- Cabral M., McNerney R., Gomes S., O'Grady L., Frame I., Sousa J., Miles M., Alexander J.** 1993. Demonstration of natural *Leishmania* infection in asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity. *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis*, **70**: 473-479.

- Cabral M., O'Grady L., Gomes S., Sousa J., Thompson H., Alexandre J.** 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, **76**: 173-180.
- Cabral M., O'Grady J., Alexander J.** 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*, **14**: 531-539.
- Cabrera M., Shaw M., Sharples C., Williams H., Castes M., Convit J., Blackwell J.** 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*, **182**: 1259-1264.
- Caceres-Dittmar G., Tapia F., Sanchez M., Yamamura M., Uyemura K., Modlin R., Bloom B., Convit J.** 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clinical and Experimental Immunology*, **91**: 500-505.
- Calheiros J., Casimiro E., Almeida A., Alves-Pires C., Collares-Pereira M., Cardoso M., Santos-Silva M., Afonso M., Sousa R.** 2006. Saúde Humana e implicações para o Turismo. In Santos, F. D. e Miranda P.(eds). Alterações Climáticas em Portugal. Cenários e Medidas de Adaptação. Projecto SIAM II. Gradiva, Lisboa. pp: 223-270.
- Callahan H., Beverley S.** 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**: 18427-18430.
- Campanelli A., Roselino A., Cavassani K., Pereira M., Mortara R., Brodskyn C., Goncalves H., Belkaid Y., Barral-Netto M., Barral A., Silva J.** 2006. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *Journal of Infectious Diseases*, **193**: 1313-1322.
- Campino L.** 1991. Aplicação de duas técnicas seroimunológicas: imunofluorescência indirecta (IFI) e contraimuno-electroforese (CIE) no estudo da leishmaniose visceral. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica em Parasitologia Médica no Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa, 77pp.
- Campino L.** 1998. Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. *Tese*. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 192 pp.
- Campino L.** 2002. Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In: World Class Parasites, vol. 4, *Leishmania*. J. P. Farrel (Ed). Kluwer Academic Publishers. Boston, Dordrech, London, 45-57.
- Campino L., Abranches P.** 2002. Leishmaniose cutânea. Uma doença rara em Portugal? *Acta Médica Portuguesa*, **15**: 387-390.
- Campino L., Bajanca R., Franca I., Pratlong F., Dedet J., Fiadeiro T.** 2005. Cutaneous leishmaniosis in Portugal due to *Leishmania infantum* MON-1. *Acta Médica Portuguesa*, **18**: 475-477.
- Campino L., Cortes S., Pires R., Oskam L., Abranches P.** 2000a. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **19**: 396-398.

- Campino L., Pratlong F., Abranches P., Rioux J., Santos-Gomes G., Alves-Pires C., Cortes S., Ramada J., Cristovao J., Afonso M., Dedet J.** 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, **11**: 1708-1714.
- Campino L., Riça-Capela M., Maurício I., Ozensoy S., Abranches P.** 1995. O kala-azar em Portugal. IX. A região do Algarve: inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa das Doenças Infecciosas*, **18**: 189-194.
- Campino L., Santos-Gomes G., Capela M., Cortes S., Abranches P.** 2000b. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **92**: 269-275.
- Campino L., Santos-Gomes G., Pratlong F., Antunes F., Maurício I., Dedet J., Abranches P.** 1997. HIV/*Leishmania* co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**: 433-436.
- Campino L., Santos-Gomes G., Pratlong F., Dedet J., Abranches P.** 1994. HIV-*Leishmania* co-infection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**: 394.
- Capela M.** 2002. Infecção por *Leishmania infantum*. Estudos parasitológicos, imunológicos e histopatológicos em modelo roedor. *Tese*. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. 132 pp.
- Cardoso L., Cabral M.** 1998. *Leishmania* e leishmaniose canina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **527**: 121-141.
- Cardoso L., Neto F., Sousa J., Rodrigues M., Cabral M.** 1998. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Veterinary Parasitology*, **79**: 213-220.
- Cardoso L., Santos H., Cordeiro-da-Silva A., Pratlong F., Dedet J., Rodrigues M.** 2002. *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Tropica*, **83**: 83-85.
- Cardoso L., Schallig H., Cordeiro-da-Silva A., Cabral M., Alunda J., Rodrigues M.** 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune response in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **117**: 35-41.
- Cardoso L., Schallig H., Neto F., Kroon N., Rodrigues M.** 2004. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica*, **91**: 95-100.
- Carmen J., Sinai A.** 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Molecular Microbiology*, **64**: 904-916.
- Carrera L., Fermín M., Tesouro M., García P., Rollán E., González J., Méndez S., Cuquerella M., Alunda J.** 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Experimental Parasitology*, **82**: 139-146.

- Carrera L., Gazzinelli R., Badolato R., Hieny S., Muller W., Kuhn R., Sacks D.** 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *Journal of Experimental Medicine*, **183**: 515-526.
- Carrillo E., Ahmed S., Goldsmith-Pestana K., Nieto J., Osorio Y., Travi B., Moreno J., McMahon-Pratt D.** 2007. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, **25**: 1534-1543.
- Carrió J., Colmenares M., Riera C., Gállego M., Arboix M., Portús M.** 2000. *Leishmania infantum*: stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. *Experimental Parasitology*, **95**: 209-214.
- Carrió J., Portús M.** 2002. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during *in vitro* or *in vivo* passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacology*, **2**: 11.
- Carrió J., Riera C., Gállego M., Portús M.** 2001. *In vitro* activity of pentavalent antimony derivatives on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* strains from humans and dogs in Spain. *Acta Tropica*, **79**: 179-183.
- Carvalho E., Bacellar O., Brownell C., Regis T., Coffman R., Reed S.** 1994. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **152**: 5949-5956.
- Carvalho E., Badaró R., Reed S., Jones T., Johnson W.** 1985. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation*, **76**: 2066-2069.
- Carvalho E., Barral A., Pedral-Sampaio D., Barral-Netto M., Badaró R., Rocha H., Johnson W.** 1992. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *Journal of Infectious Diseases*, **165**: 535-540.
- Carvalho E., Correia D., Bacellar O., Almeida R., Lessa H., Rocha H.** 1995. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **53**: 273-277.
- Carvalho E., Teixeira R., Johnson W.** 1981. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infection and Immunity*, **33**: 498-500.
- Cauchetier E., Loiseau P., Lehman J., Rivollet D., Fleury J., Astier A., Deniau M., Paul M.** 2002. Characterisation of atovaquone resistance in *Leishmania infantum* promastigotes. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1043-1051.
- Cenini P., Reeve A., Neal R.** 1989. Two new techniques for quantitative determination of *Leishmania* amastigotes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**: 194-195.
- Chamizo C., Moreno J., Alvar J.** 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **103**: 67-75.
- Chang K., Dwyer D.** 1976. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*, **193**: 678-680.

Chappuis F., Rijal S., Singh R., Acharya P., Karki B., Das M., Bovier P., Desjeux P., Le Ray D., Koirala S., Loutan L. 2003. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Tropical Medicine and International Health*, **8**: 277-285.

Chelbi I., Kaabi B., Derbali M., Ahmed S., Dellagi K., Zhioua E. 2008 Zooprophyllaxis: impact of breeding rabbits around houses on reducing the indoor abundance of *Phlebotomus papatasi*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (doi:10.1089/vbz.2007.0265.).

Chow L., Volkman S. 1998. *Plasmodium* and *Leishmania*: the role of *mdr* genes in mediating drug resistance. *Experimental Parasitology*, **90**: 135-141.

Chow L., Wong A., Ullman B., Wirth D. 1993. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **60**: 195-208.

Ciaramella P., Cortese L., Corona M., Ambrosio R., Loria A., Persechino A. 2004. Plasma thrombomodulin levels in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications*, **1**: 327-330.

Ciaramella P., Oliva G., Luna R., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record*, **141**: 539-543.

Ciháková J., Volf P. 1997. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**: 267-279.

Cillari E., Vitale G., Arcoleo F., D'Agostino P., Mocciaro C., Gambino G., Malta R., Stassi G., Giordano C., Milano S., Mansueto S. 1995. *In vivo* and *in vitro* cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. *Cytokine*, **7**: 740-745.

Coelho A., Gentil L., Silveira J., Cotrim P. 2008. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Experimental Parasitology*, (doi:10.1016/j.exppara.2008.03.018).

Coleman R., Robert L., Roberts L., Glass J., Seeley D., Laughinghouse A., Perkins P., Wirtz R. 1993. Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **30**: 499-502.

Colmenares M., Portús M., Botet J., Dobano C., Gállego M., Wolf M., Seguí G. 1995a. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *Journal of Medical Entomology*, **32**: 229-233.

Colmenares M., Portús M., Riera C., Gállego M., Aisa M., Torras S., Munoz C. 1995. Short report: detection of 72-75-kD and 123-kD fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **52**: 427-428.

Compton H., Farrell J. 2002. CD28 costimulation and parasite dose combine to influence the susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania major*. *Journal of Immunology*, **168**: 1302-1308.

- Conseil G., Deeley R., Cole S.** 2005. Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP dependent drug transporters. *Pharmacogenet Genomics*, **15**: 523-533.
- Convit J.** 1958. Leishmaniasis tegumentaria difusa: nueva entidad clinic, patologica y parasitaria. *Revista de Sanidade e Assistência Social*, **23**: 1-28.
- Coppola M., Ercolini D., Postiglione A.** 1994. La leishmaniosi viscerale umana in Campania: diagnosi di laboratorio e dati epidemiologici nel biennio 1992-1993. *Microbiologia Medica*, **9**: 170.
- Corbett Y., Herrera L., Gonzalez J., Cubilla L., Capson T., Coley P., Kursar T., Romero L., Ortega-Barria E.** 2004. A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**: 119-124.
- Corona M., Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M., Santoro D., Lombardi P.** 2004. Haemostatic disorders in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications*, **1**: 331-334.
- Corrêa A., Dossi A., Vasconcelos R., Munari D., Lima V.** 2007. Evaluation of transformation growth factor beta-1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Parasitology*, **143**: 267-274.
- Cortes S., Afonso M., Alves-Pires C., Campino L.** 2007. Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, **13**: 1431-1432.
- Cortes S., Rolão N., Ramada J., Campino L.** 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**: 12-17.
- Costa D., Favali C., Clarêncio J., Afonso L., Conceição V., Miranda J., Titus R., Valenzuela J., Barral-Netto M., Barral A., Brodskyn C.** 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity*, **72**: 1298-1305.
- Costa J., Neogy A., Vouldoukis I., Silva M., Gentilini M., Monjour L.** 1996. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**: 511-515.
- Costa R., França J., Mayrink W., Nascimento E., Genaro O., Campos-Neto A.** 2003. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **97**: 678-682.
- Coura J., Galvão-Castro B., Grimaldi Junior G.** 1987. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **82**: 581-582.
- Coutinho S., Oliveira M., Da-Cruz A., Luca P., Mendonça S., Bertho A., Soong L., McMahon-Pratt D.** 1996. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Experimental Parasitology*, **84**: 144-155.

- Craig T., Barton C., Mercer S., Droleskey B., Jones L.** 1986. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **35**: 1100-1102.
- Croft S.** 2001. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, **6**: 899-905.
- Croft S., Sundar S., Fairlamb A.** 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**: 111-126.
- Croft S., Yardley V.** 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, **8**: 319-342.
- Cruz I., Chicharro C., Nieto J., Bailo B., Cañavate C., Figueras M., Alvar J.** 2006. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 2343-2347.
- Dano K.** 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **323**: 466-483.
- Dantas-Torres F.** 2006. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology*, **141**: 1-8.
- Das G., Vohra H., Rao K., Saha B., Mishra G.** 1999. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. *Scandinavian Journal of Immunology*, **49**: 307-310.
- Das V., Ranjan A., Sinha A., Verma N., Lal C., Gupta A., Siddiqui N., Kar S.** 2001. A randomized clinical trial of low dosage combination of pentamidine and allopurinol in the treatment of antimony unresponsive cases of visceral leishmaniasis. *The Journal of the Association of Physicians of India*, **49**: 609-613.
- David J., Stamm L., Bezerra H., Souza R., Killick-Kendick R., Lima J.** 2001. Deltamethrin-impregnated plastic dog collars have a potent anti-feeding effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**: 839-847.
- Davidson A., Chen J.** 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, **73**: 241-268.
- Davidson R.** 1999. Leishmaniasis in humans, with particular reference to leishmaniasis with a canine reservoir. In *Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum* Barcelona, Spain: 72-77.
- Davies C., Kaye P., Croft S., Sundar S.** 2003. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, **326**: 377-382.
- Dawson J., Anderson B., Fishbein D., Sanchez J., Goldsmith C., Wilson K., Duntkey W.** 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**: 2741-2745.
- Dean M., Allikmets R.** 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, **5**: 779-785.

- Deane L.** 1956. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. *Tese*. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 162 pp.
- Dedet J.** 1990. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**: 25-28.
- Dedet J.** 1993. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annales de l'Institut Pasteur*, **4**: 3-25.
- Dedet J.** 1994. Leishmanioses dans le Monde. *Médecine et Armées*, **22**: 7-10.
- Dedet J.** 2000. Leishmaniasis: update. *La Presse Médicale*, **29**: 1019-1026.
- Deeley R., Cole S.** 1997. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Seminars in Cancer Biology*, **8**: 193-204.
- Delgado O., Guevara P., Silva S., Belfort E., Ramirez J.** 1996. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* using conventional immunological techniques and polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**: 267-272.
- Dereure J., Boni M., Pratlong F., Osman M., Bucheton B., El-Safi S., Feugier E., Musa M., Davoust B., Dessein A., Dedet J.** 2000. Visceral leishmaniasis in Sudan: first identifications of *Leishmania* from dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**: 154-155.
- Dereure J., El-Safi S., Bucheton B., Boni M., Kheir M., Davoust B., Pratlong F., Feugier E., Lambert M., Dessein A., Dedet J.** 2003. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes and Infection*, **5**: 1103-1108.
- Dereure J., Rioux J., Gállego M., Perières J., Pratlong F., Mahjour J., Saddiki H.** 1991a. *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 595.
- Dereure J., Rioux J., Khiami A., Pratlong F., Périères J., Martini A.** 1991b. Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. Presence, in dogs, of *Leishmania infantum* Nicolle and *Leishmania tropica* (Wright) (Kinetoplastida-Trypanonomatidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **66**: 252-255.
- Descoteaux A., Matlashewski G.** 1989. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Molecular and Cellular Biology*, **9**: 5223-5227.
- Desjardins M., Descoteaux A.** 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, **185**: 2061-2068.
- Desjeux P.** 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Statistics Quarterly*, **45**: 267-275.
- Desjeux P.** 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, **14**: 417-423.

- Dietze R., Barros G., Teixeira L., Harris J., Michelson K., Falqueto A., Corey R.** 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, **25**: 1240-1242.
- Dietze R., Falqueto A., Valli L., Rodrigues T., Boulos M., Corey R.** 1995. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **53**: 40-42.
- Ding A., Nathan C., Steer D.** 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology*, **141**: 2407-2412.
- Dipineto L., Manna L., Baiano A., Gala M., Fioretti A., Gravino A., Menna L.** 2007. Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, **43**: 518-520.
- dos-Santos W., David J., Badaró R., de-Freitas L.** 2004. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. *Parasitology Research*, **92**: 89-94.
- Drummelsmith J., Brochu V., Girard I., Messier N., Ouellette M.** 2003. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Molecular and Cell Proteomics*, **2**: 146-515.
- Duarte M., Laurenti M., Andrade, H., Corbett C.** 1988. Comparative study of the biological behaviour in hamster of two isolates of *Leishmania* characterized respectively as *L. major*-like and *L. donovani*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **30**: 21-27.
- Dube A., Sharma P., Srivastava J., Misra A., Naik S., Katiyar J.** 1998. Vaccination of langur monkeys (*Presbytis entellus*) against *Leishmania donovani* with autoclaved *L. major* plus BCG. *Parasitology*, **116**: 219-221.
- Dube A., Singh N., Sundar S., Singh N.** 2005. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Parasitology Research*, **96**: 216-223.
- Dujardin J., Campino L., Cañavate C., Dedet J., Gradoni L., Soteriadou K., Mazeris A., Ozbek Y., Marleen Boelaert M.** 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 1013-1018.
- Dunan S., Frommel D., Monjour L., Ogunkolade B., Cruz A., Quilici M.** 1989. The Phocian Veterinary study group on visceral leishmaniasis. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **11**: 397-402.
- Dunan S., Meller C., Kaplanski S., Mary C., Faugere B., Franck J., Toga I., Farnarier C., Quilici M.** 1990. Étude de l'immunité cellulaire chez des malades atteints de leishmaniose viscérale méditerranéenne. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropical*, **70**: 83-97.
- Dunan S., Toga I., Gambarelli F., Frank J., Lissouba M.** 1987. L'apport des réactions immunologiques dans le diagnostic et la surveillance de l'évolution des leishmanioses humaine et canine. *Méditerranée Médicale*, **369**: 10-17.

- Duprey Z., Steurer F., Rooney J., Kirchhoff L., Jackson J., Rowton E., Dchantz P.** 2006. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerging Infectious Diseases*, **12**: 440-446.
- Durand R., Paul M., Pratlong F., Rivollet D., Dubreuil-Lemaire M., Houin R., Astier A., Deniau M.** 1998. *Leishmania infantum*: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 2141-2143.
- Durão J., Rebêlo E., Peleteiro M., Correia J., Simoes G.** 1994. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal Concelho de Sesimbra. Nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **89**: 140-144.
- Dye C.** 1992. Leishmaniasis epidemiology: the theory catches up. *Parasitology*, **104**: 7-18.
- Dye C.** 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. . *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**: 125-130.
- Eilam Y., El-On J., Spira D.** 1985. *Leishmania major*: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. *Experimental Parasitology*, **59**: 161-168.
- Elamin A., Omer I.** 1992. Visceral leishmaniasis in a 6-week-old infant: possible congenital transmission. *Tropical Doctor*, **22**: 133-1335.
- Elnaiem D., Aboud M., Mubarek S., Hassan H., Ward R.** 1999a. Impact of pyrethroidimpregnated curtains on *Phlebotomus papatasi* sandflies indoors at Khartoum. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**: 191-197.
- Elnaiem D., Elnahas A., Aboud M.** 1999b. Protective efficacy of lamdacyhalothrin-impregnated bednets against *Phlebotomus orientalis*, the vector of visceral leishmaniasis in Sudan. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**: 310-314.
- El-Safi S., Kheir M., Bucheton B., Argiro L., Abel L., Dereure J., Dedet J., Dessein A.** 2006. Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis. *Comptes Rendus Biologies*, **329**: 863-870.
- Eltoum I., Zijlstra E., Ali M., Ghalib H., Satti M., Eltoum B., el-Hassan A.** 1992. Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **46**: 57-62.
- Engwerda C., Kaye P.** 2000. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunology Today*, **21**: 73-78.
- Engwerda C., Murphy M., Cotterell S., Smelt S., Kaye P.** 1998. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *European Journal of Immunology*, **28**: 669-680.
- Ephros M., Waldman E., Zilberstein D.** 1997. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 1064-1068.
- Escobar P., Matu S., Marques C., Croft S.** 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, **81**: 151-157.

- Evans D.** 1989. Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania*. *World Health Organization*, Geneva, 45 pp.
- Evans D., Rebêlo M.** 1996. Leishmaniose viscero-cutânea no cão doméstico: estudo laboratorial e clínico. *Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar*, 67pp.
- Evans T., Smith D., Pearson R.** 1990. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Journal of Parasitology*, **76**: 212-217.
- Fadok V., Bratton D., Frasch S., Warner M., Henson P.** 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, **5**: 551-562.
- Faghiri Z., Tabei S., Taheri F.** 1995. Study of the association of HLA class I antigens with kala-azar. *Human Heredity*, **45**: 258-261.
- Faraut-Gambarelli F., Piarroux R., Deniau M., Giusiano B., Marty P., Michel G., Faugère B., Dumon H.** 1997. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 827-830.
- Farrell J.** 2002. The immunology of cutaneous leishmaniasis: experimental infections and human disease. In "World Class Parasites" vol. 4, *Leishmania*. J. P. Farrell (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London. 193 pp.
- Fernández-Bellón H., Solano-Gallego L., Rodríguez A., Rutten V., Hoek A., Ramis A., Alberola J., Ferrer L.** 2005. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **107**: 163-169.
- Fernández-Pérez F., Gómez-Muñoz M., Méndez S., Alunda J.** 2003. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Tropica*, **86**: 83-91.
- Fernández-Pérez F., Méndez S., Fuente C., Gómez-Muñoz M., Cuquerella M., Alunda J.** 1999. Improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61**: 652-653.
- Ferreira A., Ituassu L., Melo M., Andrade A.** 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **152**: 257-263.
- Ferreira E., Lana M., Carneiro M., Reis A., Paes D., Silva E., Schallig H., Gontijo C.** 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, **146**: 235-241.
- Ferrer L.** 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In *Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, Spain: 6-10.
- Ferrer L.** 2002. The pathology of canine leishmaniasis. In *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*, Sevilha, Spain: 21-24.

- Ferroglio E., Centaro E., Mignone W., Trisciuglio A.** 2007. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot. *Veterinary Parasitology*, **144**: 162-166.
- Fichoux Y., Quaranta J., Aufeuvre J., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D., Kubar J.** 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 1953-1957.
- Finkelman F., Holmes J., Katona I., Urban J., Beckmann M., Park L., Schooley K., Coffman R., Mosmann T., Paul W.** 1990. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Annual Review of Immunology*, **8**: 303-333.
- Fisa R., Riera C., Gállego M., Manubens J., Portús M.** 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, **99**: 105-111.
- Fondevila D., Vilafranca M., Ferrer L.** 1997. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **56**: 319-327.
- Fong D., Chan M., Rodriguez R., Gately L., Berman J., Grögl M.** 1994. Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **51**: 758-766.
- Font A., Closa J., Mascort J.** 1994. Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **8**: 233-235.
- Font A., Roura X., Fondevila D., Closa J., Mascort J., Ferrer L.** 1996. Canine mucosal leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **32**: 131-137.
- Foster J.** 2005. Spontaneous and drug-induced hepatic pathology of the laboratory beagle dog, the cynomolgus and the marmoset. *Toxicologic Pathology*, **33**: 63-74.
- Foti G.** 2001. Treatment of visceral leishmaniasis. *Minerva Medica*, **92**: 245-249.
- Francino O., Altet L., Sánchez-Robert E., Rodriguez A., Solano-Gallego L., Alberala J., Ferrer L., Sánchez A., Roura X.** 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **137**: 214-221.
- Fujiwara R., Vale A., Silva J., Costa R., Jda S., Martins Filho O., Reis A., Correa Oliveira R., Machado-Coelho G., Bueno L., Bethony J.M., Frank G., Nascimento E., Genaro O., Mayrink W., Reed S., Campos-Neto A.** 2005. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, **36**: 827-838.
- Fumarola L., Spinelli R., Brandonisio O.** 2004. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*, **155**: 224-230.
- Galvão-Castro B., Ferreira J., Marzochi K., Marzochi M., Coutinho S., Lambert P.** 1984. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, **56**: 58-66.

- Gangneux J.** 1999. Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities. *Preventive Medicine*, **28**: 2057-2066.
- Gangneux J., Sulahian A., Honoré S., Meneceur P., Derouin F., Garin Y.** 2000. Evidence for determining parasitic factors in addition to host genetics and immune status in the outcome of murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **22**: 515-519.
- Gantt K., Goldman T., McCormick M., Miller M., Jeronimo S., Nascimento E., Britigan B., Wilson M.** 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Journal of Immunology*, **167**: 893-901.
- Gantt K., Schultz-Cherry S., Rodriguez N., Jeronimo S., Nascimento E., Goldman T., Recker T., Miller M., Wilson M.** 2003. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *Journal of Immunology*, **170**: 2613-2620.
- García-Alonso M., Blanco A., Viñuelas J., Mirón C., Navarrete I., Nieto C.** 1997. Immunopatologia de la uveítis en leishmaniose canina. V. Congresso Ibérico de Parasitologia, 6-10 Outubro, Évora. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **4**: 201.
- Garg R., Dube A.** 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 439-454.
- Garin Y., Sulahian A., Pratlong F., Meneceur P., Gangneux J., Prina E., Dedet J., Derouin F.** 2001. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infection and Immunity*, **69**: 7365-7373.
- Garnham P.** 1965. The leishmanias, with special reference to the role of animal reservoir. *American Zoologist*, **5**: 141-151.
- Gavvani A., Hodjati M., Mohite H., Davies C.** 2002. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*, **360**: 374-379.
- Gazola K., Ferreira A., Anacleto C., Michalick M., Andrade A., Moreira E.** 2001. Cell surface carbohydrates and in vivo infectivity of glucantime-sensitive and resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell lines. *Parasitology Research*, **87**: 935-940.
- Gebre-Hiwot A., Tadesse G., Croft S., Frommel D.** 1992. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Tropica*, **51**: 237-245.
- Gelatt K.** 2000. Ophthalmic examination and diagnostic procedures. *Essentials of Veterinary Ophthalmology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp: 1-26.
- Genaro O., Pinto J., Costa C., Silva J., Costa R., Silva J., Sanguinetti L., Vieira E., Toledo V., Mayrink W.** 1996. Phase III randomized double blind clinical trial on the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **91**: 166.
- Genaro O., Raso P., Costa C., Carvalho M., Amaral F., Botelho A., Williams P., Dias M., Mayrink W.** 1992. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **87**: 163-164.

- Getti G., Cheke R., Humber D.** 2008. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? *Parasitology*, **8**: 1-9.
- Ghose A., Mookerjee A., Sengupta K., Ghosh A., Dasgupta S., Ray P.** 1999. Therapeutic and prophylactic uses of protein A in the control of *Leishmania donovani* infection in experimental animals. *Immunology Letters*, **65**: 175-181.
- Gicheru M., Olobo J., Anjili C.** 1997. Heterologus protection by *Leishmania donovani* for *Leishmania major* infections in the Vervet monkey model of the disease. *Experimental Parasitology*, **85**: 109-116.
- Gicheru M., Olobo J., Anjili C., Orago A., Modabber F., Scott P.** 2001. Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infection and Immunity*, **69**: 245-251.
- Gifawesen C., Farrell J.** 1989. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infection and Immunity*, **57**: 3091-3096.
- Giger U., Oakley D., Owens S., Schantz P.** 2002. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*, **42**: 381-382.
- Gillespie R., Mbow M., Titus R.** 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology*, **22**: 319-331.
- Giorgio C., Faraut-Gambarelli F., Imbert A., Minodier P., Gasquet M., Dumon H.** 1999. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobiology and Chemotherapy*, **44**: 71-76.
- Giunchetti R., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O., Teixeira-Carvalho A., Roatt B., Aguiar-Soares R., Coura-Vital W., Abreu R., Malaquias L., Gontijo N., Brodskyn C., Oliveira C., Costa D., Lana M., Reis A.** 2008a. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, **26**: 623-638.
- Giunchetti R., Reis A., Silveira-Lemos D., Martins-Filho O., Corrêa-Oliveira R., Bethony J., Vale A., dQuetz J., Bueno L., França-Silva J., Nascimento E., Mayrink W., Fujiwara R.** 2008b. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, **85**: 106-112.
- Gomes R., Teixeira C., Teixeira M., Oliveira F., Menezes M., Silva C., de Oliveira C., Miranda J., Elnaiem D., Kamhawi S., Valenzuela J., Brodskyn C.** 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 7845-7850.
- Gomes Y., Cavalcanti M., Lira R., Abath F., Alves L.** 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, **175**: 45-52.
- Gomes-Pereira S.** 2003. Infecção por *Leishmania infantum* no modelo murino: influência do haplótipo H-2 na resposta imunológica celular. *Tese*. Universidade Nova de Lisboa, 195 pp.

- Gomes-Pereira S., Rodrigues O., Rolão N., Almeida P., Santos-Gomes G.** 2004. Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8(+) T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **41**: 59-68.
- Gosh S., Goswami S., Adhya S.** 2003. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *The Biochemical Journal*, **369**: 447-452.
- Gossage S., Rgers M., Bates P.** 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, **33**: 1027-1034.
- Gradoni L.** 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology*, **100**: 87-103.
- Gradoni L.** 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. In *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*, Sevilha, Spain: 7-14.
- Gradoni L., Foglia Manzillo V., Pagano A., Piantedosi D., Luna R., Gramiccia M., Scalone A., Muccio T., Oliva G.** 2005. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, **23**: 5245-5251.
- Gradoni L., Pozio E., Bettini S., Gramiccia M.** 1980. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**: 421-422.
- Gradoni L., Scalone A., Gramiccia M., Troiani M.** 1996. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. *AIDS*, **10**: 785-971.
- Gradoni L., Soteriadou K., Seridi N., Louzir H., Dakkak A., Ozensoy S., Jaffe C., Dedet J., Campino L., Cañavate C., Dujardin J.** 2008. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Tropical Medicine and International Health*, **13**: 1-5.
- Gramiccia M., Gradoni L.** 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1169-1180.
- Gramiccia M., Gradoni L., Orsini S.** 1992. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **86**: 613-620.
- Gregory D., Olivier M.** 2005. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*, **130**: 27-35.
- Grevot A., Jaussaud P., Marty P., Pratlong F., Ozon C., Haas P., Breton C., Bourdoiseau G.** 2005. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeIV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*, **12**: 271-275.
- Grögl M., Oduola A., Cordero L., Kyle D.** 1989. *Leishmania* spp.: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Experimental Parasitology*, **69**: 78-90.

- Grondin K., Künding C., Roy G., Oullette M.** 1998. Linear amplicons as precursors of amplified circles in methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Research*, **26**: 3372-3378.
- Gröne A., Fonfara S., Markus S., Baumgärtner W.** 1999. RT-PCR amplification of various canine cytokines and so-called house-keeping genes in a species-specific macrophage cell line (DH82) and canine peripheral blood leukocytes. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, **46**: 301-310.
- Gröne A., Frisk A., Baumgärtner W.** 1998. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **65**: 11-27.
- Gueiros-Filho F., Viola J., Gomes F., Farina M., Lins U., Bertho A., Wirth D., Lopes U.** 1995. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* mdr1 gene. *Experimental Parasitology*, **81**: 480-490.
- Guerin P., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S., Desjeux P., Wasunna M., Bryceson A.** 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Diseases*, **2**: 494-501.
- Guessous-Idrissi N., Berrag B., Riyad M., Sahibi H., Bichichi M., Rhalem A.** 1997. Short report: *Leishmania tropica*: etiologic agent of a case of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57**: 172-173.
- Gurunathan S., Stobie L., Prussin C., Sacks D., Glaichenhaus N., Iwasaki A., Fowell D., Locksley R., Chang J., Wu C., Seder R.** 2000. Requirements for the maintenance of Th1 immunity *in vivo* following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *Journal of Immunology*, **165**: 915-924.
- Halbig P., Hodjati M., Mazouloumi-Gavvani A., Mohite H., Davies C.** 2000. Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect dogs from sandfly bites. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**: 223-226.
- Hall L., Titus R.** 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *Journal of Immunology*, **155**: 3501-3506.
- Harith A., Kolk A., Kager P., Leeuwenburg J., Faber F., Muigai R., Kiugu S., Laarman J.** 1987. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**: 603-606.
- Harith A., Kolk A., Kager P., Leeuwenburg J., Muigai R., Kiugu S., Laarman J.** 1986. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**: 583-536.
- Harith A., Slappendel R., Reiter I., van Knapen F., Korte P., Huigen E., Kolk A.** 1989. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 2252-2257.

- Hassan A., Meredith S., Yagi H., Khalil E., Ghalib H., Abbas K., Zijlstra E., Kroon C., Schoone G., Ismail A.** 1995. Sudanese mucosal leishmaniasis: epidemiology, clinical features, diagnosis, immune responses and treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 647-652.
- Hassan M., Ghosh A., Ghosh S., Gupta M., Basu D., Mallik K., Adhya S.** 1993. Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis. *Parasitology*, **107**: 509-517.
- Heid C., Stevens J., Livak K., Williams P.** 1996. Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**: 986-994.
- Heinzel F., Sadick M., Holaday B., Coffman R., Locksley R.** 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine*, **169**: 59-72.
- Heinzel F., Sadick M., Mutha S., Locksley R.** 1991. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**: 7011-7015.
- Henderson D., Sifri C., Rodgers M., Wirth D., Hendrickson N., Ullman B.** 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Molecular and Cellular Biology*, **12**: 2855-2865.
- Henson P.** 2004. Fingering IL-12 with apoptotic cells. *Immunity*, **21**: 604-606.
- Hermoso T., Fishelson Z., Becker S., Hirschberg K., Jaffe C.** 1991. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *Embo Journal*, **10**: 4061-4067.
- Hervás J., Chacón-Manrique F., López J., Gómez-Villamandos J., Guerrero M., Moreno A.** 2001. Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. *The Veterinary Record*, **149**: 624-625.
- Hervás J., Chacón-Manrique F., Sánchez-Isarria M., Pellicer S., Carrasco L., Castillo J., Gómez-Villamandos J.** 1999. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **1**: 101-105.
- Herwaldt B.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, **354**: 1191-1199.
- Higgins C.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology*, **8**: 67-113.
- Holzmuller P., Bras-Gonçalves R., Lemesre J.** 2006. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, **132**: S19-32.
- Holzmuller P., Cavaleyra M., Moreaux J., Kovacic R., Vincendeau P., Papierok G., Lemesre J.** 2005. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **106**: 247-257.

- Holzmuller P., Sereno D., Cavaleyra M., Mangot I., Daulouede S., Vincendeau P., Lemesre J.** 2002. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infection and Immunity*, **70**: 3727-3735.
- Hommel M., Jaffe C., Travi B., Milon G.** 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89**: 55-73.
- Horber F., Lerut J., Reichen J., Zimmermann A., Jaeger P., Malinverni R.** 1993. Visceral leishmaniasis after orthotopic liver transplantation: impact of persistent splenomegaly. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, **6**: 55-57.
- Houghton R., Petrescu M., Benson D., Skeiky Y., Scalone A., Badaró R., Reed S., Gradoni L.** 1998. A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *Journal of Infectious Diseases*, **177**: 1339-1344.
- Houin R., Jolivet G., Combescot C., Deniau M., Puel F., Barbier D., Romano P.** 1977. Étude préliminaire d'un foyer de leishmaniose canine dans la région de Tours. *Colloques Internationaux du CNRS*, **239**: 109-115.
- Howard M., Pharoah M., Ashall F., Miles M.** 1991. Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 477-479.
- Howard M., Sayers G., Miles M.** 1987. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Experimental Parasitology*, **64**: 147-156.
- Huang R.** 2004. Cytokine protein arrays. *Methods in Molecular Biology*, **278**: 215-232.
- Ikeda-Garcia F., Lopes R., Marques F., Lima V., Morinishi C., Bonello F., Zanette M., Perri S., Feitosa M.** 2007. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, **143**: 254-259.
- Iniesta F., Iniesta E., Luyengo F.** 1982. Papel de perros y zorros como reservatorios de leishmanioses en la region Murciana. Resultados preliminares. *Revista Ibérica de Parasitología*, **42**: 307-313.
- Jaffe C.** 1999. Prospectives for a vaccine against canine leishmaniasis. In *Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, Spain: 66-71.
- Jayanarayan K., Dey C.** 2005. Altered tubulin dynamics, localization and post-translational modifications in sodium arsenite resistant *Leishmania donovani* in response to paclitaxel, trifluralin and a combination of both and induction of apoptosis-like cell death. *Parasitology*, **131**: 215-230.
- Jelinek T., Eichenlaub S., Loscher T.** 1999. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **18**: 669-670.

- Jha T.** 2006. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 389-398.
- Jha T., Oliaro P., Thakur C., Kanyok T., Singhanian B., Singh I., Singh N., Akhoury S., Jha S.** 1998. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *BMJ*, **316**: 1200-1205.
- Jiménez M., Gutierrez-Solar B., Benito A., Aguiar A., Garcia E., Cercenado E., Alvar J.** 1991. Cutaneous *Leishmania (L) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology*, **51**: 95-99.
- Johnson C., Yang S., Sellins K., Frank G.** 2004. Selection of HPRT primers as controls for determination of mRNA expression in dogs by RT-PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **99**: 47-51.
- Johnson R., Ngunbi P., Nwanyumba J., Roberts C.** 1993. Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, **7**: 216-218.
- Kagan I.** 1979. Diagnostic, epidemiologic, and experimental parasitology: immunologic aspects. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **28**: 429-439.
- Kalyanasundaram M., Srinivasan R., Subramanian S., Panicker K.** 1994. Relative potency of DEPA as a repellent against sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Medical and Veterinary Entomology*, **8**: 68-70.
- Kamanaka M., Yu P., Yasui T., Yoshida K., Kawabe T., Horii T., Kishimoto T., Kikutani H.** 1996. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity*, **4**: 275-281.
- Kamhawi S.** 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, **22**: 439-445.
- Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E., Sacks D.** 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*, **290**: 1351-1354.
- Karp C., El-Safi S., Wynn T., Satti M., Kordofani A., Hashim F., Hag-Ali M., Neva F., Nutman T., Sacks D.** 1993. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *Journal of Clinical Investigation*, **91**: 1644-1648.
- Karplus T., Jeronimo S., Chang H., Helms B., Burns T., Murray J., Mitchell A., Pugh E., Braz R., Bezerra F., Wilson M.** 2002. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infection and Immunity*, **70**: 6919-6925.
- Katakura K., Iwanami M., Ohtomo H., Fujise H., Hashiguchi Y.** 1999. Structural and functional analysis of the LaMDR1 multidrug resistance gene in *Leishmania amazonensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **255**: 289-294.

- Katakura K., Kawazu S., Naya T., Nagakura K., Ito M., Aikawa M., Qu J., Guan L. R., Zuo X., Chai J., Chang K., Matsumoto Y.** 1998. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**: 2173-2177.
- Katz O., Waitumbi J., Zer R., Warburg A.** 2000. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**: 145-150.
- Kaul S., Wattal B., Bhatnagar V., Mathur K.** 1978. Preliminary observations on the susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* and *Ph. papatasi* to DDT in two districts of North Bihar (India). *Journal of Communicable Diseases*, **10**: 208-211.
- Kaye P.** 2002. The immunology of visceral leishmaniasis: current status. In "World Class Parasites" vol. 4, *Leishmania*. J. P. Farrell (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrech/London. 193 pp.
- Kaye P., Cooke A., Lund T., Wattie M., Blackwell J.** 1992. Altered course of visceral leishmaniasis in mice expressing transgenic I-E molecules. *European Journal of Immunology*, **22**: 357-364.
- Kaye P., Curry A., Blackwell J.** 1991. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **146**: 2763-2770.
- Kaye P., Rogers N., Curry A., Scott J.** 1994. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *European Journal of Immunology*, **24**: 2850-2854.
- Kaye P., Svensson M., Ato M., Maroof A., Polley R., Stager S., Zubairi S., Engwerda C.** 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews*, **201**: 239-253.
- Keenan C., Hendricks L., Lightner L., Webster H., Johnson A.** 1984. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Veterinary Pathology*, **21**: 74-79.
- Kenney R., Sacks D., Gam A., Murray H., Sundar S.** 1998. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. *Journal of Infectious Diseases*, **177**: 815-818.
- Kerr J., Wyllie A., Currie A.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, **26**: 239-257.
- Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Focheux C., Dereure J., Puech M., Cadiergues M.** 1997a. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for the control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**: 105-111.
- Killick-Kendrick M., Killick-Kendrick R.** 1991. The initial establishment of sandflies colonies. *Parassitologia*, **33**: 315-320.
- Killick-Kendrick R.** 1990. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **65**: 37-42.

- Killick-Kendrick R.** 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, **17**: 279-289.
- Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Pinelli E., Real G., Molina R., Vitutia M., Cañavate M., Nieto J.** 1994. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, **1**: 311-318.
- Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Qala I., Navi N.A., Ashford R.W., Tang Y.** 1989. Preliminary observations on a tetradonematid nematode of phlebotomine sandflies of Afghanistan. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **64**: 332-339.
- Killick-Kendrick R., Leaney A., Ready P., Molyneux D.** 1997b. *Leishmania* in flebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomya longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **196**: 105-115.
- Killick-Kendrick R., Molyneux D., Ashford R.** 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **187**: 409-419.
- Killick-Kendrick R., Wallbanks K., Molyneux D., Lavin D.** 1988. The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology Research*, **74**: 586-590.
- Killick-Kendrick R., Ward R.** 1981. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology*, **82**: 143-152.
- Kima P.** 2007. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology*, **37**: 1087-1096.
- Kima P., Soong L., Chicharro C., Ruddle N., McMahon-Pratt D.** 1996. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology*, **26**: 3163-3169.
- Kimblin N., Peters N., Debrabant A., Secundino N., Egen J., Lawyer P., Fay M., Kamhawi S., Sacks D.** 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 10125-10130.
- Kirkpatrick C., Farrell J., Goldschmidt M.** 1984. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Experimental Parasitology*, **58**: 125-131.
- Kirkpatrick C., Nolan T., Farrell J.** 1987. Rate of *Leishmania*-induced skin-lesion development in rodents depends on the site of inoculation. *Parasitology*, **94**: 451-465.
- Kishore K., Kumar V., Kesari S., Dinesh D., Kumar A., Das P., Bhattacharya S.** 2006. Vector control in leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 467-472.
- Koehler K., Stechele M., Hetzel U., Domingo M., Schönian G., Zahner H., Burkhardt E.** 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, **109**: 9-17.

- Kohanteb J., Ardehali S., Rezai H.** 1987. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**: 578-580.
- Kolodziej H., Kayser O., Kiderlen A., Ito H., Hatano T., Yoshida T., Foo L.** 2001. Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α -release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **24**: 1016-1021.
- Konecny P., Stagg, A., Jebbari H., English N., Davidson R., Knight S.** 1999. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *European Journal of Immunology*, **29**: 1803-1811.
- Koutinas A., Polizopoulou Z., Saridomichelakis M., Argyriadis D., Fytianou A., Plevraki K.** 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, **35**: 376-383.
- Koutinas A., Saridomichelakis M., Mylonakis M., Leontides L., Polizopoulou Z., Billinis C., Argyriadis D., Diakou N., Papadopoulos O.** 2001. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **98**: 247-261.
- Kuchler K., Thorner J.** 1992. Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: the role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators. *Endocrine Reviews*, **13**: 499-514.
- Lage R., Oliveira G., Busek S., Guerra L., Giunchetti R., Corrêa-Oliveira R., Reis A.** 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **153**: 135-145.
- Lainson R., Shaw J.** 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In "The leishmaniasis in Biology and Medicine" vol. 1, Biology and Epidemiology. R. Killick-Kendrick (Eds.) W. Peters. Academic Press, New York, London. p. 1-120.
- Lambson B., Smyth A., Barker D.** 2000. *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology*, **94**: 15-22.
- Lang T., Hellio R., Kaye P., Antoine J.** 1994. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *Journal of Cell Science*, **107**: 2137-2150.
- Lang T., Prina E., Sibthorpe D., Blackwell J.** 1997. Nramp1 transfection transfers *Ity/Lsh/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infection and Immunity*, **65**: 380-386.
- Lanotte G., Rioux J., Perieres J., Vollhardt Y.** 1979. Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 10. Les forms évolutives de la leishmaniose visceral canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Annales de Parasitologie*, **54**: 277-295.
- Lara M., Layrisse Z., Scorza J., Garcia E., Stoikow Z., Granados J., Bias W.** 1991. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. *Human Immunology*, **30**: 129-135.

- Laskay T., Diefenbach A., Rollinghoff M., Solbach W.** 1995. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology*, **25**: 2220-2227.
- Laskay T., Wittmann I., Diefenbach A., Röllinghoff M., Solbach W.** 1997. Control of *Leishmania major* infection in BALB/c mice by inhibition of early lymphocyte entry into peripheral lymph nodes. *Journal of Immunology*, **158**: 1246-1253.
- Laskay T., Zandbergen G., Solbach W.** 2003. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, **11**: 210-214.
- Laskay T., Zandbergen G., Solbach W.** 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, **213**: 183-191.
- Lasri S., Sahibi H., Sadak A., Jaffe C., Rhalem A.** 1999. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Veterinary Research*, **30**: 441-449.
- Latyshev N., Shoshina M., Polyakov A.** 1951. Essays on the regional Parasitology of Middle Asia. II. Visceral and cutaneous leishmaniasis in the Town Osh (Kirgisia). *Problems of Regional, General and Experimental Parasitology Medical Zoology, Moscow*, **7**: 63-69.
- Laufs H., Müller K., Fleischer J., Reiling N., Jahnke N., Jensenius J., Solbach W., Laskay T.** 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunity*, **70**: 826-835.
- Launois P., Conceição-Silva F., Himmerlich H., Parra-Lopez C., Tacchini-Cottier F., Louis J.** 1998. Setting in motion the immune mechanisms underlying genetically determined resistance and susceptibility to infection with *Leishmania major*. *Parasite Immunology*, **20**: 223-230.
- Leandro C., Santos-Gomes G., Campino L., Romão P., Cortes S., Rolão N., Gomes-Pereira S., Riça-Capela M., Abranches P.** 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **79**: 273-284.
- Leclercq V., Lebastard M., Belkaid Y., Louis J., Milon G.** 1996. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the *Lsh* and MHC loci. *Journal of Immunology*, **157**: 4537-4545.
- Lee N., Bertholet S., Debrabant A., Muller J., Duncan R., Nakhasi H.** 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death and Differentiation*, **9**: 53-64.
- Lehmann J., Alber G.** 1998. Murine leishmaniosis: a paradigm for the importance of T helper 1 and T helper 2 cells. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, **17**: 176-187.
- Leiva M., Lloret A., Pena T., Roura X.** 2005. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology*, **8**: 71-75.
- Lella F., Vincenti V., Zennaro D., Afeltra A., Baldi A., Giordano D., Pasanisi E., Bacciu A., Bacciu S., Lella G.** 2006. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **35**: 870-872.

- Lemesre J., Holzmuller P., Cavaleyra M., Goncalves R., Hottin G., Papierok G.** 2005. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*, **23**: 2825-2840.
- Lemesre J., Holzmuller P., Gonçalves R., Bourdoiseau G., Hugnet C., Cavaleyra M., Papierok G.** 2007. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, **25**: 4223-4234.
- Liew F.** 1990. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **155**: 53-64.
- Liew F., Li Y., Millott S.** 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *Journal of Immunology*, **145**: 4306-4310.
- Liew F., O'Donnell C.** 1993. Immunology of leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, **32**: 161-259.
- Lima H., Rodríguez N., Barrios M., Avila A., Cañizales I., Gutiérrez S.** 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **103**: 412-414.
- Lima H., Titus R.** 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, **64**: 5442-5445.
- Lima V., Peiro J., Vasconcelos R.** 2007. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **115**: 189-193.
- Lima W., Michalick M., Melo M., Tafuri W., Tafuri W.** 2004. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*, **92**: 43-53.
- Lipoldová M., Demant P.** 2006. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews. Genetics*, **7**: 294-305.
- Lira R., Sundar S., Makharia A., Kenney R., Gam A., Saraiva E., Sacks D.** 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *Journal of Infectious Diseases*, **180**: 564-567.
- Locksley R., Heinzel F., Sadick M., Holaday B., Gardner K.** 1987. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Annales de l'Institut Pasteur. Immunologie*, **138**: 744-749.
- Locksley R., Reiner S., Hatam F., Littman D., Killeen N.** 1993. Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science*, **261**: 1448-1451.
- Locksley R., Scott P.** 1991. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunol Today*, **12**: A58-61.
- Lubova.** 1973. In: Kellina, O.I. 1981. Problem and current lines in investigations on the epidemiology of leishmaniasis and its control in the URSS. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **74**: 306-318.

- Lüder C., Gross U., Lopes M.** 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in Parasitology*, **17**: 480-486.
- Maarouf M., Adeline M., Solignac M., Vautrin D., Robert-Gero M.** 1998. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite*, **5**: 167-173.
- Maarouf M., Lawrence F., Croft S., Robert-Gero M.** 1995. Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitology Research*, **81**: 421-425.
- Madeira M., Schubach A., Schubach T., Pereira S., Figueiredo F., Baptista C., Leal C., Melo C., Confort E., Marzochi M.** 2006. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **138**: 366-370.
- Maia C., Afonso M., Dionísio L., Campino L.** 2007a. Leishmaniasis survey in Algarve Region, Portugal: canine reservoir and phlebotomine sandflies. *X Congresso Ibérico de Parasitologia*. Madrid, Espanha. (www.ucm.es/info/CIP2007.madrid).
- Maia C., Campino L.** 2008. Diagnosis of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* (Vet.Par. 2008; doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.028).
- Maia C., Cristovão J., Ramada J., Gonçalves L., Campino L.** 2007b. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal* (Vet J 2007; doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009).
- Maia C., Nunes M., Campino L.** 2008. Importance of cats on zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, **8**: 555-560.
- Maia C., Rolão N., Nunes M., Gonçalves L., Campino L.** 2007c. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, **90**: 123-126.
- Maio J., Lopes A., Soares I., Nereu V.** 1986. Kala-azar. Análise casuística do Serviço de Pediatria do Hospital Distrital de Faro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **9**: 177-180.
- Majori G., Maroli M., Sabatinelli G., Fausto A.** 1989. Efficacy of permethrin-impregnated curtains against endophilic phlebotomine sandflies in Burkina Faso. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**: 441-444.
- Malla N., Mahajan R.** 2006. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 267-274.
- Maluish A., Strong D.** 1986. Lymphocyte proliferation. In: *Manual of clinical laboratory immunology*, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 241-281.
- Mancianti F., Gramiccia M., Gradoni L., Pieri S.** 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**: 566-567.
- Mancianti F., Sozzi S.** 1995. Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 402.

- Mancianti F., Tardoni S., Melosi M.** 2002. Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Parassitologia*, **44**: 99.
- Manna L., Reale S., Viola E., Vitale F., Manzillo V., Michele P., Caracappa S., Gravino A.** 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, **142**: 271-280.
- Manna L., Reale S., Vitale F., Pavone L., Gravino A.** 2007. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimonite and allopurinol. *The Veterinary Journal* 2007; doi:10.1016/j.tvjl.2007.04.013.
- Manna L., Vitale F., Reale S., Caracappa S., Pavone L., Morte R., Cringoli G., Staiano N., Gravino A.** 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **125**: 251-262.
- Manso J., Dias F., Neto E.** 1998. Leishmaníase cutânea localizada. *Acta Pediátrica Portuguesa*, **29**: 21-24.
- Manson-Bahr P.** 1961. Immunity in kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**: 550-555.
- Mansueto S., Di Leo R., Miceli M., Quartararo P.** 1982. Canine leishmaniasis in three foci in Western Sicily. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**: 565-566.
- Marcos J., Ferrer A., Granados F., Masera J., Rodríguez B., Jiménez A., Lainez A., Rodríguez-Mancheño A.** 2007. Localized leishmaniasis of the oral mucosa. A report of three cases. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, **12**: 281-286.
- Maroli M., Mizzon V., Siragusa C., D'Oorazi A., Gradoni L.** 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 358-363.
- Maroli M., Pennisi M., Muccio., Khoury C., Gradoni L., Gramiccia M.** 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, **145**: 357-360.
- Martin A., Clynes M.** 1991. Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, **27**: 183-184.
- Martínez J., Travi B., Valencia A., Saravia N.** 1991. Metastatic capability of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in golden hamsters. *Journal of Parasitology*, **77**: 762-768.
- Martínez-Moreno A., Moreno T., Martinez-Moreno F., Acosta I., Hernandez S.** 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **48**: 209-220.
- Martínez-Ortega E., Conesa-Gallego C., Macfarlane D., Ward R.** 1983. Ectoparasitic mites on phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Spain. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **77**: 545-546.
- Martín-Sánchez J., Acedo C., Muñoz-Pérez M., Pesson B., Marchal O., Morillas-Márquez F.** 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, **145**: 267-273.

- Marty P., Fichoux Y., Giordana D., Brugnetti A.** 1992. Leishmanin reaction in the human population of a highly endemic focus of canine leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**: 249-250.
- Marty P., Levièvre A., Quaranta J., Suffia I., Eulalio M., Gari-Toussaint M., Fichoux Y., Kubar J.** 1995. Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 690-691.
- Marty P., Pratlong F., Marcelet B., Adda A., Fichoux Y.** 1994. *Leishmania infantum* variant MON-24 isolé d'une lésion cutanée dans la banlieu de Nice (France). *Parasite*, **1**: 175-176.
- Mary C., Lamouroux D., Dunan S., Quilici M.** 1992. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **47**: 764-771.
- Masina S., Gicheru M., Demotz S., Fasel N.** 2003. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *Journal of Infectious Diseases*, **188**: 1250-1257.
- Maurício I., Stothard J., Miles M.** 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, **16**: 188-189.
- Mayrink W., Genaro O., Silva J., Costa R., Tafuri W., Toledo V., Silva A., Reis A., Williams P., Costa P.** 1996. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **91**: 695-697.
- Mbongo N., Loiseau P., Billion M., Robert-Gero M.** 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 352-357.
- McConkey S., López A., Shaw D., Calder J.** 2002. Leishmanial polyarthritis in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, **43**: 607-609.
- McNeely T., Turco S.** 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *Journal of Immunology*, **144**: 2745-2750.
- Meddeb-Garnaoui A., Gritli S., Garbouj S., Fadhel M., Kares R., Mansour L., Kaabi B., Chouchane L., Salah A., Dellagi K.** 2001. Association analysis of HLA-class II and class III gene polymorphisms in the susceptibility to mediterranean visceral leishmaniasis. *Human Immunology*, **62**: 509-517.
- Medrano F., Jiménez-Mejías E., Calderón E., Regordan C., Leal M.** 1993. An easy and quick method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals. *AIDS*, **7**: 1399.
- Mehta A., Shaha C.** 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**: 11798-11813.
- Meinecke C., Schottelius J., Oskam L., Fleischer B.** 1999. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*, **104**: 65.

- Melby P., Chandrasekar B., Zhao W., Coe J.** 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *Journal of Immunology*, **166**: 1912-1920.
- Melby P., Yang Y., Cheng J., Zhao W.** 1998. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, **66**: 18-27.
- Mello G.** 1997. Probabilidades e Estatísticas, conceitos e métodos fundamentais II. Escolar Editora. Portugal, 686 pp.
- Mencke N., Volf P., Volfova V., Stanneck D.** 2003. Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research*, **90**: S108-111.
- Méndez S. Nell M., Alunda J.** 1996. *Leishmania infantum*: infection of macrophages in vitro with promastigotes. *International Journal for Parasitology*, **26**: 619-622.
- Méndez S., Fernandez-Perez F., Santín M., Fuente C., Cuquerella M., Gómez-Muñoz M., Alunda J.** 2001. Correlation between *in vitro* and *in vivo* infectivity of *Leishmania infantum* clones. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**: 616-621.
- Meredith S., Kroon N., Sondorp E., Seaman, J., Goris M., Ingen C., Oosting H., Schoone G., Terpstra W., Oskam L.** 1995. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**: 1742-1745.
- Meredith S., Zijlstra E., Schoone G., Kroon C., Van Eys, G., Schaeffer K., el-Hassan A., Lawyer P.** 1993. Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **70**: 419-431.
- Mettler M., Grimm F., Capelli G., Camp H., Deplazes P.** 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 5515-5519.
- Millesimo M., Zucca M., Caramello P., Savoia D.** 1996. Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **26**: 7-11.
- Miralles G., Stoeckle M. McDermott D., Finkelman F., Murray H.** 1994. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **62**: 1058-1063.
- Miró G., Cardoso L., Pennisi M., Oliva G., Baneth G.** 2008. Canine leishmaniosis - New concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, **24**: 371-377.
- Miró G., Gálvez R., Mateo M., Montoya A., Descalzo M., Molina R.** 2007. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology*, **143**: 375-379.

- Miró G., Oliva G., Mortarino M., Cruz I., Cañavate C., Vischer C., Bianciardi P.** 2007. Comparative clinical efficacy and safety of miltefosine-allopurinol versus meglumine antimoniate-allopurinol in the treatment of canine leishmaniasis: preliminary results of a multi-centric, controlled field study, *Southern European Veterinary Conference*, Barcelona, Espanha.
- Mishell B., Shiigi S.** 1980. Selected Methods in Cellular Immunology. Freeman & Co., San Francisco, CA, 486 pp.
- Mittal V., Sehgal S., Yadav T., Singh V.** 1987. Congenital transmission of kala-azar. *The Journal of Communicable Diseases*, **19**: 184-185.
- Mohamed H., Ibrahim M., Miller E., Peacock C., Khalil E., Cordell H., Howson J., Hassan A., Bereir R., Blackwell J.** 2003. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. *Genes and Immunity*, **4**: 351-355.
- Mohebbali M., Fallah E., Jamshidi S., Hajjaran H.** 1998. Vaccine trial against canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*, **4**: 234-238.
- Mohebbali M., Khamesipour A., Mobedi I., Zarei Z., Hashemi-Fesharki R.** 2004a. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine*, **22**: 4097-4100.
- Mohebbali M., Taran M., Zarei Z.** 2004b. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Veterinary Parasitology*, **121**: 239-245.
- Molano I., Alonso M., Miron C., Redondo E., Requena J., Soto M., Nieto C., Alonso C.** 2003. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, **92**: 1-13.
- Molina R., Amela C., Nieto J., San-Andres M., González F., Castillo J.A., Lucientes J., Alvar J.** 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Plebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**: 491-493.
- Molina R., Lohse J., Nieto J.** 2001. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sand fly (*Plebotomus perniciosus*) in dogs. *Veterinary Therapeutics*, **2**: 261-267.
- Molina R., Miró G., Gálvez R., Nieto J., Descalzo M.** 2006. Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *The Veterinary Record*, **159**: 206-209.
- Molyneux D., Killick-Kendrick R.** 1987. Morphology ultrastructure and life cycles. In "The leishmaniasis in biology and medicine". W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.). Academic Press, London. 941 pp.
- Monjour L., Mille C., Druilhe P., Gentilini M.** 1978. Application de l'immuno-electro-diffusion, surmembrane d'acetate de cellulose, au diagnostic de le leishmaniose visceral humaine et canine. *Annales de la Société de Médecine Tropicale*, **58**: 293-300.

- Montenegro J.** 1926. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archiv Für Dermatologie und Syphilis*, **13**: 187-194.
- Moore K., Matlashewski G.** 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology*, **152**: 2930-2937.
- Mor G., Eliza M.** 2001. Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. *Molecular Biotechnology*, **19**: 245-250.
- Moreno J, Alvar J.** 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, **18**: 399-405.
- Moreno J., Nieto J., Chamizo C., González F., Blanco F., Barrer D., Alvar J.** 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after chemotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **71**:181-195.
- Moreno J., Nieto J., Cruz I., Chicharro C., Chamizo C., Garcia E., Ares M., Cañavate C., Alvar J.** 2003. Experimental canine leishmaniasis. Different routes of inoculation may determine the outcome of the disease. In: *Seventh Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference*, Woods Hole, Massachusetts, USA.
- Moreno J., Nieto J., Masina S., Cañavate C., Cruz I., Chicharro C., Carrillo E., Napp S., Reymond C., Kaye P., Smith D., Fasel N., Alvar J.** 2007. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*, **25**: 5290-5300.
- Morsy T., Schnur L., Feinsod F., Salem A., Wahba M., Said S.** 1987. Natural infections of *Leishmania major* in domestic dogs from Alexandria, Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **37**: 39-52.
- Mortarino M., Franceschi A., Mancianti F., Bazzocchi C., Genchi C., Bandi C.** 2004. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia*, **46**: 163-167.
- Mosmann T., Coffman R.** 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, **7**: 145-173.
- Mosser D., Brittingham A.** 1997. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, **115**: 9-23.
- Mosser D., Edelson P.** 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *Journal of Immunology*, **132**: 1501-1505.
- Moura T., Oliveira F., Novais F., Miranda J., Clarêncio J., Follador I., Carvalho E., Valenzuela J., Barral-Neto M., Barral A., Brodskyn C., Oliveira C.** 2007. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **1**: 84-93.
- Mozaffarian N., Berman J., Casadevall A.** 1997. Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 1825-1829.
- Mukhopadhyay A., Hati A., Chakraborty S., Saxena N.** 1996. Effect of DDT on *Phlebotomus* sandflies in Kala-Azar endemic foci in West Bengal. *The Journal of Communicable Diseases*, **28**: 171-175.

- Murray H.** 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *International Journal of Experimental Pathology*, **82**: 249-67.
- Murray H., Granger A., Mohanty S.** 1991. Response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis: T-cell dependent but Interferon- γ - and Interleukin-2- independent. *Journal of Infectious Diseases*, **163**: 622-624.
- Murray H., Jungbluth A., Ritter E., Montelibano C., Marino M.** 2000. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. *Infection and Immunity*, **68**: 6289-6293.
- Mutinga M., Basimike M., Mutero C., Ngindu A.** 1992. The use of permethrin-impregnated wall cloth (MBU cloth) for control of vectors of malaria and leishmaniasis in the Kenya. II. Effect on phlebotomine sandfly populations. *Insects of Science and its Application*, **13**: 163-172.
- Mutinga M., Renapurkar D., Wachira D., Basimike M., Mutero C.** 1993. A bioassay to evaluate the efficacy of permethrin-impregnated screens used against phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae) in Baringo district of Kenya. *East African Medical Journal*, **70**: 168-170.
- Nabors G., Nolan T., Croop W., Li J., Farrell J.** 1995. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunology*, **17**: 569-579.
- Naranjo C., Fondevila D., Leiva M., Roura X., Peña T.** 2005. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **133**: 37-47.
- Nascimento D., Costa J., Fiori B., Viana G., Filho M., Alvim A., Bastos O., Nakatani M., Reed S., Badaró R., Silva A., Burattini M.** 1996. The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **29**: 233-240.
- Natera S., Machuca C., Padrón-Nieves M., Romero A., Díaz E., Ponte-Sucre A.** 2007. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **29**: 637-642.
- Neogy A., Vouldoukis J., Silva O., Tselentis Y., Lascombe J., Segalen T., Rzepka D., Monjour L.** 1992. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **47**: 772-777.
- Neves R., Cardoso L., Afonso M., Campino L.** 2007. Leishmaniose canina em Portugal Continental-o que sabem os proprietários de cães acerca desta zoonose parasitária. *Veterinary Medicine*, **52**: 47-54.
- Nicolas L., Milon G., Prina E.** 2002a. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **51**: 295-299.
- Nicolas L., Prina E., Lang T., Milon G.** 2002b. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 1666-1669.

- Nicolle C., Comye C.** 1908. Origine canine du kala-azar. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **2**: 59-62.
- Nieto C., Garcia-Alonso M., Requena J., Miron C., Soto M., Alonso C., Navarrete I.** 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **67**: 117-130.
- Nogueira F., Moreira M., Borja-Cabrera G., Santos F., Menz I., Parra L., Xu Z., Chu H., Palatnik-de-Sousa C., Luvizotto M.** 2005. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, **23**: 4805-4810.
- Noli C., Auxilia S.** 2005. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, **16**: 213-232.
- Norsworthy N., Sun J., Elnaïem D., Lanzaro G., Soong L.** 2004. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and Immunity*, **72**: 1240-1247.
- Nunes C., Lima V., Paula H., Perri S., Andrade A., Dias F., Burattini M.** 2008. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, **153**: 19-23.
- Nuwayri-Salti N., Matta M., Shbaklo Z., Lakkis M., Kabbani Z.** 1998. Behavior in a mouse model of isolates of *Leishmania donovani* sensu lato cultured from the blood of patients with chronic cutaneous lesions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**: 710-714.
- Nyakundi P., Muigai R., Were J., Oster C., Gachihi G., Kirigi G.** 1988. Congenital visceral leishmaniasis: case report. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**: 564.
- Oddo F., Cascio G.** 1963. Il test di immuno-fluorescenza nelle leishmaniosi visceral e cutanea. *Rivista dell'Istituto Sieroterapico Italiano*, **38**: 139-145.
- Ogosuku E., Pérez J., Paz L., Nieto E., Monje J., Guerra H.** 1994. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **88**: 329-335.
- Ogunkolade B., Colomb-Valet I., Monjour L., Rhodes-Feuillette A., Abita J., Frommel D.** 1990. Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. *Acta Tropica*, **47**: 171-176.
- Oliva G., Gradoni L., Ciaramella P., De Luna R., Cortese L., Orsini S., Davidson R., Persechino A.** 1995. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Antimicrobiology and Chemotherapy*, **36**: 1013-1019.
- Oliveira C., Teixeira M., Gomes R., Barral A., Brodskyn C.** 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, **1**: 81-86.
- Oliveira G., Santoro F., Sadigursky M.** 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **88**: 243-248.

- Olivier M., Brownsey R., Reiner N.** 1992. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, **89**: 7481-7485.
- Olivier M., Gregory D., Forget G.** 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*, **18**: 293-305.
- Olivier M., Proulx C., Tanner C.** 1989. Importance of lymphokines in the control of multiplication and dispersion of *Leishmania donovani* within liver macrophages of resistant and susceptible mice. *Journal of Parasitology*, **75**: 720-727.
- Opat A., Ng K., Currie G., Handman E., Bacic A.** 1996. Characterization of lipophosphoglycan from a ricin-resistant mutant of *Leishmania major*. *Glycobiology*, **6**: 387-397.
- Ordeix L., Solano-Gallego L., Fondevila D., Ferrer L., Fondati A.** 2005. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Veterinary Dermatology*, **16**: 187-191.
- Osorio L., Castillo C., Ochoa M.** 1998. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 49-52.
- Ostyn B, Vanlerberghe V, Picado A, Dinesh DS, Sundar S, Chappuis F, Rijal S, Dujardin JC, Coosemans M, Boelaert M, Davies C.** 2008. Vector control by insecticide-treated nets in the fight against visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent, what is the evidence? *Tropical Medicine and International Health*. (DOI: 10.1111/j.1365-3156.2008.02110.x).
- Oswald C., Holland I., Schmitt L.** 2006. The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **372**: 385-399.
- Ott K., Hanson W., Stauber L.** 1967. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *Journal of Parasitology*, **53**: 641-645.
- Ouellette M.** 2001. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicine and International Health*, **6**: 874-882.
- Ozon C., Marty P., Pratlong F., Breton C., Blein M., Lelievre A., Haas P.** 1998. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in southern France. *Veterinary Parasitology*, **75**: 273-277.
- Paciello O., Oliva G., Gradoni L., Manna L., Papparella S.** 2006. Inflammatory muscle disease in dogs is associated with *Leishmania infantum*. *Neuromuscular Disorder*, **16**: 691.
- Palatnik-de-Sousa C.** 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, **26**: 1709-1724.
- Paranhos-Silva M., Oliveira G., Reis E., Menezes R., Fernandes O., Sherlock I., Gomes R., Pontes-de-Carvalho L., dos-Santos W.** 2003. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary Parasitology*, **114**: 97-111.

- Paris C., Loiseau P., Bories C., Bréard J.** 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 852-859.
- Passos V., Lasmar E., Gontijo C., Fernandes O., Degrave W.** 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **91**: 19-20.
- Paul W.** 1993. Infectious diseases and the immune system. *Scientific American*, **269**: 90-97.
- Peacock C., Sanjeevi C., Shaw M., Collins A., Campbell R., March R., Silveira F., Costa J., Coste C., Nascimento M., Siddiqui R., Shaw J., Blackwell J.** 2002. Genetic analysis of multicase families of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: no major role for class II or class III regions of HLA. *Genes and Immunology*, **3**: 350-358.
- Pearson R., Sousa Q.** 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, **22**: 1-13.
- Pearson R., Steigbigel R.** 1980. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *Journal of Immunology*, **125**: 2195-2201.
- Peña M., Naranjo C., Klauss G., Fondevila D., Leiva M., Roura X., Davidson M., Dubielzig R.** 2008. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, **138**: 32-39.
- Pener H., Wilamowski A.** 1996. Susceptibility of larvae of the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) to *Bacillus sphaericus*. *Bulletin of Entomological Research*, **86**: 173-175.
- Pennisi M.** 2002. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*, Sevilha, Spain: 39-48.
- Pennisi M., Masucci M., Catarsini O.** 1998. Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in FIV+ gatti che vivono in zona endemic area. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, **52**: 265-266.
- Pennisi M., Reale S., Giudice S., Masucci M., Caracappa S., Vitale M., Vitale F.** 2005. Real-Time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary Research Communications*, **21**: 301-303.
- Pennisi M., Venza M., Reale S., Vitale F., Giudice S.** 2004. Case report of leishmaniasis in four cats. *Veterinary Research Communications*, **28**: 363-366.
- Pérez-Victoria J., Pérez-Victoria F., Parodi-Talice A., Jiménez I., Ravelo A., Castanys S., Gamarro F.** 2001. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 2468-2474.
- Petanides T., Koutinas A., Mylonakis M., Day M., Saridomichelakis M., Leontides L., Mischke R., Diniz P., Breitschwerdt E., Kritsepi M., Garipidou V., Koutinas C., Lekkas S.** 2008. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural Canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **22**: 866-872.

Peters N., Egen J., Secundino N., Debrabant A., Kimblin N., Kamhawi S., Lawyer P., Fay M., Germain R., Sacks D. 2008. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, **321**: 970-974.

Petrisceva P. 1961. Methods of study and the prophylaxis of the leishmaniasis and sandfly fever. *Medgiz*, Moscow (In: Dedet, 1976).

Petzl-Erler M., Belich M., Queiroz-Telles F. 1991. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Human Immunology*, **32**: 254-620.

Piarroux R., Azaiez R., Lossi A., Reynier P., Muscatelli F., Gambarelli F., Fontes M., Dumon H., Quilici M. 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**: 364-369.

Piarroux R., Gambarelli F., Dumon H., Fontes M., Dunan S., Mary C., Toga B., Quilici M. 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**: 746-749.

Piarroux R., Garnier J., Gambarelli F., Dumon H., Kaplanski S., Unal D. 1996. Resistance of *Leishmania infantum* to Glucantime: risk factors and therapeutic management. *Archives de Pediatrie*, **3**: 352-356.

Pimenta P., Modi G., Pereira S., Shahabuddin M., Sacks D. 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, **115**: 359-369.

Pimenta P., Turco S., McConville M., Lawyer P., Perkins P., Sacks D. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**: 1812-1815.

Pinelli E., Gebhard D., Mommaas A., Hoeij M., Langermans J., Ruitenber E., Rutten V. 2000. Infection of a canine macrophage cell line with leishmania infantum: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Veterinary Parasitology*, **92**: 181-189.

Pinelli E., Gonzalo R., Boog C., Rutten V., Gebhard D., Real G., Ruitenber E. 1995. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology*, **25**: 1594-1600.

Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., Real G., Ruitenber J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, **62**: 229-235.

Pinelli E., Rutten V., Bruysters M., Moore P., Ruitenber E. 1999. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infection and Immunity*, **67**: 237-243.

Piñero J., Martínez S., Castillo A., Portús M., Valladares B. 2002 *In vitro* susceptibility of *Leishmania infantum* strains isolated from Spanish HIV-positive patients to Abelcet and Fungizone. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **50**: 304-306.

- Pires C.** 1979. Contribuição para o conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (Díptera, Psychodidae). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais*, **19**: 197-210.
- Pires C.** 1984. *Phlebotomus* of Portugal. I--Natural infestation of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 and *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania* in the zoonotic focus of Arrabida (Portugal). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **59**: 521-524.
- Pires C.** 2000. Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de Leishmanioses em Portugal. *Tese*. Universidade Nova de Lisboa, 228 pp.
- Pires C., Capela M., Aguiar P.** 1997a. Acção repelente de um piretróide – Dowing spray em *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **4**: 203.
- Pires C., Santos-Gomes G., Pratlong F., Ribeiro H., Campino L., Abranches P.** 1991. Les phlébotomes du Portugal. IV- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **66**: 47-48.
- Pires C., Tang Y., Killick-Kendrick R.** 1997b. *Didilia* sp. (Tetradonematidae: Mermithoidea:Nematoda) a parasite of *Phlebotomus sergenti* in Portugal. *Parasite*, **2**: 191-192.
- Poli A., Abramo F., Barsotti P., Leva S., Gramiccia M., Ludovisi A., Mancianti F.** 2002. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, **106**: 181–191.
- Poot J., Rogers M., Bates P., Vermeulen A.** 2005. Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. *Veterinary Parasitology*, **130**: 41-53.
- Portús M., Gállego M., Riera C., Aisa M., Fisa R., Castillejo S.** 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, **62**: 72-76.
- Pozio E., Gradoni L., Bettini S., Gramiccia M.** 1981. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the province of Grosseto. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **75**: 393-395.
- Pozio E., Maroli M., Gradoni L., Gramiccia M.** 1985. Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**: 524-526.
- Pratlong F., Dedet J., Marty P., Portús M., Deniau M., Dereure J., Abranches P., Reynes J., Martini A., Lefebvre M., Rioux J.** 1995. *Leishmania*-Humaine immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: Isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *The Journal of Infectious Diseases*, **172**: 323-326.
- Proudfoot L., Nikolaev A., Feng G., Wei W., Ferguson M., Brimacombe J., Liew F.** 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**: 10984-10989.

- Proudfoot L., O'Donnell C., Liew F.** 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology*, **25**: 745-750.
- Puentes S., Sacks D., Silva R., Joiner K.** 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, **167**: 887-902.
- Puentes S., Silva R., Sacks D., Hammer C., Joiner K.** 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of Immunology*, **145**: 4311-4316.
- Qadoumi M., Becker I., Donhauser N., Rölinghoff M., Bogdan C.** 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **70**: 4638-4642.
- Qu J., Zhong L., Masoom-Yasinzai M., Abdur-Rab M., Aksu H., Reed S., Chang K., Gilman-Sachs A.** 1994. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**: 543-545.
- Quinnell R., Courtney O., Shaw M., Day M., Garcez L., Dye C., Kaye P.** 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, **183**: 1421-1424.
- Quinnell R., Kennedy L., Barnes A., Courtenay O., Dye C., Garcez L., Shaw M., Carter S., Thomson W., Ollier W.** 2003. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, **55**: 23-28.
- Rab M., Evans D.** 1995. *Leishmania infantum* in the Himalayas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 27-32.
- Rafati S., Nakhaee A., Taheri T., Taslimi Y., Darabi H., Eravani D., Sanos S., Kaye P., Taghikhani M., Jamshidi S., Rad M.** 2005. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine*, **23**: 3716-3725.
- Rallis T., Day M., Saridomichelakis M., Adamama-Moraitou K., Papazoglou L., Fytianou A., Koutinas A.** 2005. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of comparative pathology*, **132**: 145-152.
- Ramalho-Ortigão J., Kamhawi S., Joshi M., Reynoso D., Lawyer P., Dwyer D., Sacks D., Valenzuela J.** 2005. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Molecular Biology*, **14**: 703-712.
- Ramiro M., Zarate J., Hanke T., Rodriguez D., Rodriguez J., Esteban M., Lucientes J., Castillo J., Larraga V.** 2003. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, **21**: 2474-2484.
- Ramos A., Farinhote A.** 1952. Contribuição para o conhecimento do kala-azar em Portugal. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, **2**: 1485-1500.

- Ramos A., Maslov D., Fernandes O., Campbell D., Simpson L.** 1996. Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. *Experimental Parasitology*, **82**: 242-250.
- Ramos I., Alonso A., Marcen J., Peris A., Castillo J., Colmenares M., Larraga V.** 2008. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine*, **26**: 333-344.
- Rangel H., Dagger F., Hernandez A., Liendo A., Urbina J.** 1996. Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**: 2785-2791.
- Ravel C., Cortes S., Pratlong F., Morio F., Dedet J., Campino L.** 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, **36**: 1383-1388.
- Raziuddin S., Telmasani A., el-Awad M., al-Amari O., al-Janadi M.** 1992. Gamma delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, **22**: 1143-1148.
- Rebêlo M.** 1993. Nota prévia acerca de um lobo, *Canis lupus* L. 1758, infectado por *Leishmania* sp em Portugal. *Veterinária Técnica*, **3**: 32-35.
- Reed S., Scott P.** 1993. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology*, **5**: 524-531.
- Reiner N.** 1987. Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. *Journal of Immunology*, **138**: 1919-1925.
- Reiner S., Locksley R.** 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*, **13**: 151-177.
- Reithinger R., Davies C.** 2002. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends in Parasitology*, **18**: 289-290.
- Reithinger R., Quinnell R., Alexander B., Davies C.** 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 2352-2356.
- Requena J., Soto M., Doria M., Alonso C.** 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **76**: 269-281.
- Rey J., Travi B., Valencia A., Saravia N.** 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**: 623-631.
- Rezai H., Ardehali S., Amirhakimi G., Kharazmi A.** 1978. Immunological features of kala-azar. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **27**: 1079-1083.

- Rhalem A., Sahibi H., Guessous-Idrissi N., Lasri S., Natami A., Riyad M., Berrag B.** 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, **81**: 173-184.
- Ribera E., Cucurull E., Ocaña I., Vallespi T., Gasser I., Juste C.** 1995. Visceral leishmaniasis in patients with HIV infection. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **13**: 73-79.
- Riça-Capela M., Cortes S., Leandro C., Peleteiro M., Santos-Gomes G., Campino L.** 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitology Research*, **89**: 163-169.
- Richardson F.** 1926. A probable case of equine leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **19**: 411.
- Riera C., Valladares J.** 1996. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today*, **12**: 412.
- Rijal S., Yardley V., Chappuis F., Decuyper S., Khanal B., Singh R., Boelaert M., Doncker S., Croft S., Dujardin J.** 2007. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of *in vivo* therapy outcome? *Microbes and Infection*, **9**: 529-535.
- Rioux J., Albaret J., Hoiun R., Dedet J., Lanotte G.** 1968. Écologie des leishmanioses dans Le Sud de France. 2. Les reservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes* L.). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **43**: 421-428.
- Rioux J., Golvan Y., Croset H., Tour S., Hoiun R., Abonnenc E., Petitdidier M., Volhardt Y., Dedet J., Albaret J., Lanotte G., Quillici M.** 1969. Épidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France. *Monographie de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, n° 37. Ministère des Affaires Sociales, Paris, 220 pp.
- Rittig M., Bogdan C.** 2000. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, **16**: 292-297.
- Robert L., Perich M., Schlein Y., Jacobson R., Wirtz R., Lawyer P., Githure J.** 1997. Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **13**: 140-144.
- Rocha P., Almeida R., Bacellar O., Jesus A., Filho D., Filho A., Barral A., Coffman R., Carvalho E.** 1999. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, **180**: 1731-1734.
- Rodrigues C., Batista L., Teixeira M., Pereira A., Santos P., Oliveira G., Freitas L., Veras P.** 2007. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, **143**: 197-205.
- Rodríguez-Cortés A., Fernández-Bellón H., Ramis A., Ferrer L., Alberola J., Solano-Gallego L.** 2007a. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **116**: 190-198.

- Rodríguez-Cortés A., Ojeda A., López-Fuertes L., Timón M., Altet L., Solano-Gallego L., Sánchez-Robert E., Francino O., Alberola J.** 2007b. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, **37**: 683-693.
- Rogers K., DeKrey G., Mbow M., Gillespie R., Brodskyn C., Titus R.** 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters*, **209**: 1-7.
- Rogers M., Chance M., Bates P.** 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, **124**: 495-508.
- Rogers M., Nikolaev A., Ferguson M., Bates P.** 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, **430**: 463-467.
- Rogers M., Sizova O., Ferguson M., Nikolaev A., Bates P.** 2006. Synthetic glycovaccine protects against the bite of leishmania-infected sand flies. *Journal of Infectious Diseases*, **194**: 512-518.
- Rogers P., Jenkins J., Chapman S., Ndebele K., Chapman B., Cleary J.** 1998. Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines. *Journal of Infectious Diseases*, **178**: 1726-1733.
- Rohousová I., Volf P.** 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica*, **53**: 161-171.
- Rohousová I., Volf P., Lipoldová M.** 2005. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite Immunology*, **27**: 469-473.
- Rohtagi A., Agarwal S., Bose M., Chattopadhyaya D., Saha K.** 1996. Blood, bone marrow and splenic lymphocyte subset profiles in Indian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**: 431-434.
- Roitt I., Brostoff J., Male D.** 1996. Immunology (4th ed.). Mosby, London. 18.10-18.19.
- Rolão N.** 2004. O parasitismo e a resposta imunitária local em murganhos BALB/c infectados por *Leishmania infantum*. Tese. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. 160 pp.
- Rolão N., Cortes S., Gomes-Pereira S., Campino L.** 2007. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, **115**: 270-276.
- Rolão N., Cortes S., Rodrigues O., Campino L.** 2004a. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time PCR and PCR-ELISA. *Journal of Parasitology*, **90**: 1150-1154.
- Rolão N., Martins M., João A., Campino L.** 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, **12**: 183-186.
- Rolão N., Melo C., Campino L.** 2004b. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, **90**: 123-126.

- Rolland L., Zilberfarb V., Furtado A., Gentilini M.** 1994. Identification of a 94 kilodalton antigen on *Leishmania* promastigote forms and its specific recognition in human and canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **16**: 599-609.
- Rosenthal E., Marty P., Poizot-Martin I., Reynes J., Pratlong F., Lafeuillade A., Jaubert D., Boulat O., Dereure J., Gambarelli F., Gastaut J., Dujardin P., Dellamonic P., Cassuto J.** 1995. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in Southern France. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 159-162.
- Rosenthal L., Sutterwala F., Kehrli M., Mosser D.** 1996. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and Immunity*, **64**: 2206-2215.
- Rosenthal P., Chaisson R., Hadley W., Leech J.** 1988. Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *The American Journal of Medicine*, **84**: 307-309.
- Rosypal A., Troy G., Duncan R., Zajac A., Lindsay D.** 2005a. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **19**: 802-809.
- Rosypal A., Troy G., Zajac A., Frank G., Lindsay D.** 2005b. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*, **91**: 970-972.
- Rosypal A., Zajac A., Lindsay D.** 2003. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, **33**: 921-937.
- Rousseau D., Demartino S., Anjuere F., Ferrua B., Fragaki K., Le Fichoux Y., Kubar J.** 2001. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. *European Cytokine Network*, **12**: 340-347.
- Roze M.** 1986. Manifestations oculaires de la leishmaniose canine. *Recueil Médecine Vétérinaire*, **162**: 19-26.
- Roze M.** 2005. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *EJCAP*, **15**: 39-52.
- Rufenacht S., Sager H., Muller N., Schaerer V., Heier A., Welle M., Roosje P.** 2005. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *The Veterinary Record*, **156**: 542-545.
- Ryter S., Kim H., Hoetzel A., Park J., Nakahira K., Wang X., Choi A.** 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, **9**: 49-89.
- Sacerdoti-Sierra N., Siman-Tov N., Aspira M., Jaffe C.** 1997. Leishmanial protein kinases and parasite survival. Abstr. 1. *Acta Parasitologica Turcica*, **21**: 3.
- Sacks D., Hieny S., Sher A.** 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *Journal of Immunology*, **135**: 564-569.
- Sacks D., Kamhawi S.** 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 453-483.

- Sádlová J.** 1999. The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta of the Society of Zoology of Bohemia*, **63**: 331-366.
- Safi S., Evans D.** 1989. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**: 334-337.
- Saha B., Das G., Vohra H., Ganguly N., Mishra G.** 1995. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *European Journal of Immunology*, **25**: 2492-2498.
- Saha B., Nanda-Roy H., Pakrashi A., Chakrabarti R., Roy S.** 1991. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. I. Changes in lymphoid organs and their possible role in pathogenesis. *European Journal of Immunology*, **21**: 577-581.
- Saldarriaga O., Travi B., Park W., Perez L., Melby P.** 2006. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine*, **24**: 1928-1940.
- Sampaio-Silva M., Campino L., Avelino I., Santos-Gomes G., Seixas-Lopes A.** 1993. Kala-azar em Portugal. VIII. Estudo epidemiológico da leishmaniose canina em três concelhos do Alto-Douro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **16**: 241-244.
- Samuelson J., Lerner E., Tesh R., Titus R.** 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine*, **173**: 49-54.
- Sanchez J., Marquez F., Sanchez C.** 1995. The variability of the etiological agent of leishmaniasis in the north-east of the Almeria Region, south-east Spain. *Systematic Parasitology*, **30**: 233-238.
- Sanchez J., Martinez F., Lecea J., Rabasco C., Sanchez C., Martin M., Florencio V., Marquez F.** 1996. *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 from Southern Spain: Characterization of the strains from human visceral and cutaneous leishmaniasis and from sandflies; with a numerical analysis of the isoenzymatic data. *Systematic Parasitology*, **33**: 177-182.
- Sanchez-Robert E., Altet L., Utzet-Sadurni M., Giger U., Sanchez A., Francino O.** 2008. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, **39**: 36.
- Sangraula H., Sharma K., Rijal S., Dwivedi S., Koirala S.** 2003. Orally effective drugs for kala-azar (visceral leishmaniasis): focus on miltefosine and sitamaquine. *The Journal of the Association of Physicians of India*, **51**: 686-690.
- Santos M., Marcos R., Assunção M., Matos A.** 2006. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology*, **141**: 340-344.
- Santos-Gomes G.** 1995. Caracterização biológica de *Leishmania infantum*. Estudos da virulência e patogenia da infecção de estirpes isoladas em Portugal. *Tese*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 163 pp.

- Santos-Gomes G., Campino L., Abranches P.** 2000a. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **95**: 193-198.
- Santos-Gomes G., Capela M., Ramada J., Campino L.** 2003. Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, **87**: 235-244.
- Santos-Gomes G., Gomes-Pereira S., Campino L., Araújo M., Abranches P.** 2000b. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-*Leishmania* sp.-coinfected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 175-178.
- Santos-Gomes G., Rosa R., Leandro C., Cortes S., Romão P., Silveira H.** 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **88**: 21-30.
- Saraiva E., Barbosa A., Santos F., Borja-Cabrera G., Nico D., Souza L., Mendes-Aguiar C., Souza E., Fampa P., Parra L., Menz I., Dias J., Oliveira S., Palatnik-de-Sousa C.** 2006. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, **24**: 2423-2431.
- Saridomichelakis M., Koutinas A., Olivry T., Dunston S., Farmaki R., Koutinas C., Petanides T.** 2007. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology*, **18**: 227-233.
- Saridomichelakis M., Mylonakis M., Leontides L., Billinis C., Koutinas A., Galatos A., Gouletsou P., Diakou A., Kontos V.** 2005. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Veterinary Parasitology*, **130**: 199-205.
- Sarkari B., Chance M., Hommel M.** 2002. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Tropica*, **82**: 339-348.
- Satta G., Gramiccia M., Pintore A., Solinas G., Puggioni G., Ullio A., Gradoni L.** 1997. An investigation on leishmaniasis by leishmanin skin test in Northern Sardinia, Italy. Worldleish 1, 5-9 May, Istanbul. *Acta Parasitologica Turcica*, **21**: 142.
- Savani E., Camargo M., Carvalho M., Zampieri R., Santos M., D'Auria S., Shaw J., Floeter-Winter L.** 2004. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **120**: 229-233.
- Scalone A., Luna R., Oliva G., Baldi L., Satta G., Vesco G., Mignone W., Trilli C., Mondesire R., Simpson D., Donoghue A., Frank G., Gradoni L.** 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay, *Veterinary Parasitology*, **104**: 275-285.
- Schallig H., Canto-Cavaleiro M., Silva E.** 2002a. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**: 1015-1018.

- Schallig H., Cardoso L., Hommers M., Kroon C., Belling G., Rodrigues M., Semião-Santos S., Vetter H.** 2004. Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 193-197.
- Schallig H., Oskam L.** 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health*, **7**: 641-651.
- Schallig H., Schoone G., Beijer E., Kroon C., Hommers M., Özbel Y., Özensoy S., Silva E., Cardoso L., Silva E.** 2002b. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology*, **109**: 1-8.
- Scharton T., Scott P.** 1993. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *Journal of Experimental Medicine*, **178**: 567-577.
- Scharton-Kersten T., Afonso L., Wysocka M., Trinchieri G., Scott P.** 1995. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **154**: 5320-5330.
- Schlein Y.** 1993. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, **7**: 255-258.
- Schlein Y., Jacobson R., Shlomai J.** 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **245**: 121-126.
- Schonian G., Nazereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Shallig H., Presber W., Jaffe C.** 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, **47**: 349-358.
- Schrey C., Pires C., Macvean D.** 1989. Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**: 125-130.
- Schubach T., Figueiredo F., Pereira S., Madeira M., Santos I., Andrade M., Cuzzi T., Marzochi M., Schubach A.** 2004. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**: 165-167.
- Scott P., Natovitz P., Coffman R., Pearce E., Sher A.** 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine*, **168**: 1675-1684.
- Searle S., Bright N., Roach T., Atkinson P., Barton C., Meloen R., Blackwell J.** 1998. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *Journal of Cell Science*, **111**: 2855-2866.
- Seay M., Heard P., Chaudhuri G.** 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infection and Immunity*, **64**: 5129-5137.

- Secundino N., Eger-Mangrich I., Braga E., Santoro M., Pimenta P.** 2005. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *Journal of Medical Entomology*, **42**: 928-938.
- Seifert K., Matu S., Pérez-Victoria F., Castanys S., Gamarro F., Croft S.** 2003. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *International Journal of Antimicrobial Agents*, **22**: 380-387.
- Seifert K., Pérez-Victoria F., Stettler M., Sánchez-Cañete M., Castanys S., Gamarro F., Croft S.** 2007. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **30**: 229-235.
- Semião-Santos S., Harith A., Ferreira E., Pires C., Sousa C., Gusmão R.** 1995. Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitology Research*, **81**: 235-239.
- Serarslan G., Atik E.** 2005. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **280**: 147-149.
- Sereno D., Guilvard E., Maquaire S., Cavaleyra M., Holzmüller P., Ouaisi A., Lemesre J.** 2001a. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the *in vitro* life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Tropica*, **80**: 195-205.
- Sereno D., Holzmüller P., Mangot I., Cuny G., Ouaisi A., Lemesre J.** 2001b. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 2064-2069.
- Sereno D., Lemesre J.** 1997. *In vitro* life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 1898-1903.
- Sereno D., Silva A., Mathieu-Daude F., Ouaisi A.** 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International*, **56**: 3-7.
- Sergent E., Lombard J., Quilichini M.** 1912. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **5**: 93-98.
- Shaha C.** 2006. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. 2006. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 233-244.
- Shapiro T., Were J., Danso K., Nelson D., Desjardins R., Pamplin C.** 1991. Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **49**: 506-514.
- Sharief A., Khalil E., Theander T., Kharazmi A., Omer S., Ibrahim M.** 2006. *Leishmania donovani*: an *in vitro* study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Experimental Parasitology*, **114**: 247-252.
- Shaw J.** 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**: 471-478.

- Shehata M., Baker A.** 1996. Mites infesting phlebotomine sandflies in southern Sinai, Egypt. *Medical and Veterinary Entomology*, **10**: 193-196.
- Sheskin D.** 2000. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. (Ed.) Chapman & Hall/CRC. New York Corporate, Blve, Boca Ratón, Florida, 692-708.
- Silva E., Meide W., Schoone G., Gontijo C., Schallig H., Brazil R.** 2006. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communications*, **30**: 637-643.
- Silva N., Camacho N., Figarella K., Ponte-Sucre A.** 2004. Cell differentiation and infectivity of *Leishmania mexicana* are inhibited in a strain resistant to an ABC-transporter blocker. *Parasitology*, **128**: 629-634.
- Silva R., Hall B., Joiner K., Sacks D.** 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *Journal of Immunology*, **143**: 617-622.
- Silva V., Borja-Cabrera G., Pontes N., Souza E., Luz K., Palatnik M., Palatnik-de-Sousa C.** 2000. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, **19**: 1082-1092.
- Simões-Mattos L., Mattos M., Rodrigues T., Prata Júnior J., Teixeira M., Silva T., Holanda C., Pereira B., Lopes C., Pompeu M.** 2001a. Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of Fortaleza, Northeast of Brazil. *Revista Ciência Animal*, **11**: 79-81.
- Simões-Mattos L., Mattos M., Teixeira M., Oliveira-Lima J., Bevilacqua C., Prata-Júnior R., Holanda C., Rondon F., Bastos K., Coêlho Z., Coêlho I., Barral A., Pompeu M.** 2005. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, **127**: 199-208.
- Simões-Mattos L., Mattos M., Teixeira M., Rodrigues T., Silva T., Sucupira B., Holanda C., Prata-Júnior J., Pompeu M., Coelho I.** 2001b. *Leishmania chagasi* – antibodies detected by ELISA assay in domestic cats (*Felis catus*) from urban area of Fortaleza, Northeast of Brazil. *Revista Ciência Animal*, **11**: 194.
- Singer V., Jones L., Yue S., Haugland R.** 1997. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry*, **249**: 228-238.
- Singh A., Papadopolou B., Ouellette M.** 2001. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Experimental Parasitology*, **99**: 141-147.
- Singh N.** 2006. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 411-422.
- Singh N., Sundar S., Williams F., Curran M., Rastogi A., Agrawal S., Middleton D.** 1997. Molecular typing of HLA class I and class II antigens in Indian kala-azar patients. *Tropical Medicine and International Health*, **5**: 468-471.
- Singh R., Das R., Sharma S.** 2001. Resistance of sandflies to DDT in kala-azar endemic districts of Bihar, India. *Bulletin of World Health Organization*, **79**: 793.

- Singh S., Chaudrhy V., Wali J.** 1996. Transfusion-transmitted kala-azar in India. *Transfusion*, **36**: 848-849.
- Singh S., Gilman-Sachs A., Chang K., Reed S.** 1995. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, **81**: 1000-1003.
- Sisto M., Brandonisio O., Panaro M., Acquafredda A., Leogrande D., Fasanella A., Trotta T., Fumarola L., Mitolo V.** 2001. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **24**: 247-254.
- Skamene E., Schurr E., Gros P.** 1998. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annual Review of Medicine*, **49**: 275-287.
- Skeiky Y., Guderian J., Benson D., Bacelar O., Carvalho E., Kubin M., Badaró R., Trinchieri G., Reed S.** 1995. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *Journal of Experimental Medicine*, **181**: 1527-1537.
- Slappendel R.** 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, **10**: 1-16.
- Slappendel R., Teske E.** 1999. A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. In *Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, Espanha: 54-59.
- Smith D., Searle S., Ready P., Gramiccia M., Ben-Ismael R.** 1989. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania major*: sequence homologies between regions of *Leishmania* minicircles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **37**: 213-223.
- Smyth A., Ghosh A., Hassan M., Basu D., Bruijn M., Adhya S., Mallik K., Barker D.** 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105**: 183-192.
- Sobrino R., Ferroglio E., Oleaga A., Romano A., Millan J., Revilla M., Arnal M., Trisciuglio A., Gortázar C.** 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, **155**: 198-203.
- Sokol-Anderson M., Brajtburg J., Medoff G.** 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *Journal of Infectious Diseases*, **154**: 6-83.
- Solano-Gallego L., Fernández-Bellón H., Morell P., Fondevila D., Alberola J., Ramis A., Ferrer L.** 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of comparative pathology*, **130**: 7-12.
- Solano-Gallego L., Fernández-Bellón H., Serra R., Gállego M., Ramis A., Fondevila D., Ferrer L.** 2003. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Veterinary Journal*, **35**: 320-323.
- Solano-Gallego L., Llull J., Arboix M., Ferrer L., Alberola J.** 2001a. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, **102**: 163-166.
- Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J., Ferrer L.** 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, **90**: 37-45.

- Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L.** 2001b. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 560-563.
- Solano-Gallego L., Rodríguez-Cortés A., Iniesta L., Quintana J., Pastor J., Espada Y., Portús M., Alberola J.** 2007a. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**: 676-680.
- Solano-Gallego L., Rodríguez-Cortés A., Trotta M., Zampieron C., Razia L., Furlanello T., Caldin M., Roura X., Alberola J.** 2007b. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **147**: 315-9.
- Soong L., Duboise S., Kima P., McMahon-Pratt D.** 1995. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **63**: 3559-3566.
- Sorensen A., Hey A., Kharazmi A.** 1994. *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, **102**: 265-271.
- Souza A., Barros E., Ishikawa E., Ilha I., Marin G., Nunes V.** 2005. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **128**: 41-45.
- Souza A., Juliano R., Gomes T., Diniz S., Borges A., Tafuri W., Santos R.** 2005. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology*, **129**: 51-54.
- Souza-Leão S., Lang T., Prina E., Hellio R., Antoine J.** 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science*, **108**: 3219-3231.
- Squier M., Sehnert A., Cohen J.** 1995. Apoptosis in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, **57**: 2-10.
- Stager S., Alexander J., Carter K., Brombacher F., Kaye P.** 2003. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infection and Immunity*, **71**: 4804-4807.
- Stanley A., Engwerda C.** 2007. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*, **85**: 138-417.
- Stanley E., Heard P.** 1977. Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 4305-4312.
- Stenger S., Thuring H., Rollinghoff M., Bogdan C.** 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine*, **180**: 783-793.

- Stierhof Y., Bates P., Jacobson R., Rogers M., Schlein Y., Handman E., Ilg T.** 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology*, **78**: 675-689.
- Strauss-Ayali D., Baneth G., Jaffe C.** 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, **38**: 547-564.
- Strauss-Ayali D., Baneth G., Shor S., Okano F., Jaffe C.** 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *International Journal for Parasitology*, **35**: 63-73.
- Strauss-Ayali D., Jaffe C., Burshtain O., Gonen L., Baneth G.** 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, **189**: 1729-1733.
- Streit J., Recker T., Filho F., Beverley S., Wilson M.** 2001. Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. *Journal of Immunology*, **166**: 1921-1929.
- Sudhandiran G., Shaha C.** 2003. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 25120-25132.
- Sundar S.** 2001. Drug resistance in India visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, **6**: 849-854.
- Sundar S., Chatterjee M.** 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 345-352.
- Sundar S., Jha T., Thakur C., Bhattacharya S., Rai M.** 2006. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**: 26-33.
- Sundar S., Jha T., Thakur C., Engel J., Sindermann H., Fischer C., Junge K., Bryceson A., Berman J.** 2002. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, **347**: 1739-1746.
- Sundar S., Jha T., Thakur C., Sinha P., Bhattacharya S.** 2007. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine*, **356**: 2571-2581.
- Sundar S., Pai K., Kumar R., Pathak-Tripathi K., Gam A., Ray M., Kenney R.** 2001. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **65**: 193-196.
- Sundar S., Rai M.** 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9**: 951-958.
- Sundar S., Reed S., Sharma S., Mehrotra A., Murray H.** 1997. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **56**: 522-525.

- Sundar S., Reed S., Singh V., Kumar P., Murray H.** 1998. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*, **351**: 563-565.
- Sunderkötter C., Kunz M., Steinbrink K., Meinardus-Hager G., Goebeler M., Bildau H., Sorg C.** 1993. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology*, **151**: 4891-4901.
- Svobodová M., Votypka J., Nicolas L., Volf P.** 2003. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and Infection*, **5**: 361-364.
- Symmers W.** 1960. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet*, **16**: 127-132.
- Tabar M., Altet L., Francino O., Sánchez A., Ferrer L., Roura X.** 2008. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). *Veterinary Parasitology*, **151**: 332-336.
- Tafuri W., Oliveira M., Melo M., Tafuri W.** 2001. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, **96**: 203-212.
- Tafuri W., Santos R., Arantes R., Gonçalves R., Melo M., Michalick M., Tafuri, W.** 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, **292**: 17-23.
- Tesh R.** 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **52**: 287-292.
- Tesh R., Modi G.** 1984. Studies on the biology of phleboviruses in sand flies (Diptera: Psychodidae). I. Experimental infection of the vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **33**: 1007-1016.
- Tetreault G., Zayed A., Hanafi H., Beavers G., Zeichner B.** 2001. Susceptibility of sand flies to selected insecticides in North Africa and the Middle East. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **17**: 23-27.
- Thakur C., Kanyok T., Pandey A., Sinha G., Zaniewski A., Houlihan H., Olliaro P.** 2000. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**: 429-431.
- Thakur C., Pandey A., Sinha G., Roy S., Behbehani K., Olliaro P.** 1996. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**: 319-322.
- Thakur C., Singh R., Hassan S., Kumar R., Narain S., Kumar A.** 1999. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**: 319-323.

- Theodos C., Povinelli L., Molina R., Sherry B., Titus R.** 1991. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity *in vitro* and resistance to cutaneous leishmaniasis *in vivo*. *Infection and Immunity*, **59**: 2839-2842.
- Titus R.** 1998. Salivary gland lysate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* suppresses the immune response of mice to sheep red blood cells *in vivo* and concanavalin A *in vitro*. *Experimental Parasitology*, **89**: 133-136.
- Titus R., Ribeiro J.** 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, **239**: 1306-1308.
- Tokuda Y., Tsuji M., Yamazaki M., Kimura S., Abe S., Yamaguchi H.** 1993. Augmentation of murine tumor necrosis factor production by amphotericin B *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 2228-2230.
- Tomson N., Symonds R., Moir A., Kendall C., Wiselka M.** 2002. New World leishmaniasis from Spain. *Postgraduate Medical Journal*, **78**: 757-758.
- Travi B., Tabares C., Cadena H., Ferro C., Osorio Y.** 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **64**: 119-124.
- Turrel I., Pool R.** 1982. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. *American Journal Radiology Journal*, **23**: 243-249.
- Ullman B.** 1995. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **27**: 77-84.
- Valladares J., Gopegui R., Riera C., Alberola J., Gállego M., Espada Y., Portús M., Arboix M.** 1998. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science*, **64**: 195-198.
- Valladares J., Riera C., González-Ensenyat P., Díez-Cascón A., Ramos G., Solano-Gallego L., Gállego M., Portús M., Arboix M., Alberola J.** 2001. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. *Veterinary Parasitology*, **97**: 15-21.
- Van Damme P., Keuter M., Van Assen S., Wilde P., Beckers P.** 2004. A rare case of oral leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, **4**: 53.
- Van Eys G., Schoone G., Kroon N., Ebeling S.** 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **51**: 133-142.
- Vergnes B., Gourbal B., Girard I., Sundar S., Drummelsmith J., Ouellette M.** 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**: 88-101.
- Verma N., Dey C.** 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 3010-3015.

- Vexenat J., Olliaro P., Fonseca de Castro J., Cavalcante R., Furtado J., Tavares J., Miles M.** 1998. Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**: 448-453.
- Vicente A.** 1990. Kala-azar infantil. Dados epidemiológicos e incidência do kala-azar no Internamento de Pediatria do Hospital de Faro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **13**: 173-182.
- Vinayak V., Mahajan D., Sobti R., Singla N., Sundar S.** 1994. Anti-66 kDa antileishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, **99**: 109-114.
- Viñuelas J., García-Alonso M., Ferrando L., Navarrete I., Molano I., Mirón C., Carcelén J., Alonso C., Nieto C.** 2001. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, **101**: 23-27.
- Vita S., Santori D., Aguzzi I., Petrotta E., Luciani A.** 2005. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Veterinary Research Communications*, **29S**: 319-321.
- Volf P., Benkova I., Myskova J., Sadlova J., Campino L., Ravel C.** 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology*, **37**: 589-593.
- Volf P., Hostomska J., Rohousova I.** 2008. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*, **15**: 237-243.
- Voll R., Herrmann M., Roth E., Stach C., Kalden J., Girkontaite I.** 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, **390**: 350-351.
- Vonk A., Netea M., Denecker N., Verschueren I., Meer J., Kullberg B.** 1998. Modulation of the pro- and anti-inflammatory cytokine balance by amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 469-474.
- Waitumbi J., Warburg A.** 1998. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infection and Immunity*, **66**: 1534-1537.
- Walters L., Irons K., Guzman H., Tesh R.** 1993. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **30**: 179-198.
- Walters L., Modi G., Tesh R., Burrage T.** 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **36**: 294-314.
- Wanderley J., Benjamin A., Real F., Bonomo A., Moreira M., Barcinski M.** 2005. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**: 807-812.
- Wang X., McGregor C., Miller V.** 1998. Induction and cDNA sequence of inducible nitric oxide synthase from canine aortic smooth muscle cells. *The American Journal of Physiology*, **275**: 1122-1129.

- Wang Z., Zheng S., Corry D., Dalton D., Seder R., Reiner S., Locksley R.** 1994. Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 12932-12936.
- Warburg A., Saraiva E., Lanzaro G., Titus R., Neva F.** 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **345**: 223-230.
- Warburg A., Waitumbi J.** 1997. Sandfly saliva and leishmaniosis. *Acta Parasitologica Turcica*, **21**: 67.
- Wasunna M., Rashid J., Mbui J., Kirigi G., Kinoti D., Lodenyo H., Felton J., Sabin A., Albert M., Horton J.** 2005. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**: 871-876.
- Wellman M., Krakowka S., Jacobs R., Kociba G.** 1988. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **24**: 223-229.
- WHO**, 1990. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO committee. WHO Technical Report Series, **793**. World Health Organization, Geneve, 177 pp.
- WHO**, 1980. Report of a training seminar on epidemiological methods for the leishmaniasis. Moscow, Baku, Samarkand. *TDR/LEIS*. Geneve, **80.3**.
- WHO**, 1995. Report on the consultative meeting on *Leishmania*/HIV co-infection. *WHO/LEIS*. Geneve, **95.35**, (ed. <http://www.who.int>).
- WHO**, 2000. Leishmaniasis (Kala-azar), (ed. <http://www.who.int>).
- WHO**, 2004. Report on Leishmaniasis. Geneve *TDR/SWG/04* (www.who.int/tdr).
- Will A., Blank C., Rollinghoff M., Moll H.** 1992. Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, **22**: 1341-1347.
- Williams C., Espinosa O., Montenegro H., Cubilla L., Capson T., Ortega-Barría E., Romero L.** 2003. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiological Methods*, **55**: 813-816.
- Wilson M., Recker T., Rodriguez N., Young B., Burnell K., Streit J., Kline J.** 2002. The TGF-beta response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. *European Journal of Immunology*, **32**: 3556-3565.
- Wilson M., Sandor M., Blum A., Young B., Metwali A., Elliott D., Lynch R., Weinstock J.** 1996. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *Journal of Immunology*, **156**: 2231-2239.
- Wilson M., Weinstock J.** 1996. Hepatic granulomas in murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Methods*, **9**: 248-254.

- Wilson M., Young B., Davidson B., Mente K., McGowan S.** 1998. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **161**: 6148-6155.
- Wolday D., Akuffo H., Demissie A., Britton S.** 1999. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infection and Immunity*, **67**: 5258-5264.
- Xavier S., Andrade H., Haddad S., Chiarelli I., Lima W., Michalick M., Tafuri W., Tafuri W.** 2006. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*, **2**: 17.
- Yadav T., Gupta H., Satteya U., Kumar R., Mittal V.** 1989. Congenital Kala-Azar. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **83**: 535-537.
- Yuval B., Warburg A.** 1989. Susceptibility of adult phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **83**: 195-196.
- Zafra R., Jaber J., Pérez-Ecija R., Barragán A., Martínez-Moreno A., Pérez J.** 2008. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **123**: 353-359.
- Zambrano-Villa S., Rosales-Borjas D., Carrero J., Ortiz-Ortiz L.** 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*, **18**: 272-278.
- Zandbergen G., Bollinger A., Wenzel A., Kamhawi S., Voll R., Klinger M., Müller A., Hölscher C., Herrmann M., Sacks D., Solbach W., Laskay T.** 2006. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 13837-13842.
- Zandbergen G., Hermann N., Laufs H., Solbach W., Laskay T.** 2002. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity*, **70**: 4177-4184.
- Zandbergen G., Klinger M., Mueller A., Dannenberg S., Gebert A., Solbach W., Laskay T.** 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of Immunology*, **173**: 6521-6525.
- Zandbergen G., Solbach W., Laskay T.** 2007. Apoptosis driven infection. *Autoimmunity*, **40**: 349-352.
- Zangger H., Mottram J., Fasel N.** 2002. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death and Differentiation*, **9**: 1126-1139.
- Zhi-Biao X., Blancq S., Evans D., Peters W.** 1984. The characterization by isoenzyme electrophoresis of *Leishmania* isolated in the people's Republic of China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **78**: 689.
- Zijlstra E., El-Hassan A.** 1993. Leishmanin and tuberculin sensitivity in leishmaniasis in the Sudan, with special reference to kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**: 425-427.

Zijlstra E., El-Hassan A. 2001. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **95S**: S27-58.

Zijlstra E., Musa A., Khalil E., El-Hassan I., El-Hassan A. 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, **3**: 87-98.

Zijlstra E., Nur Y., Desjeux P., Khalil E., El-Hassan A., Groen J. 2001. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Tropical Medicine and International Health*, **6**: 108-113.

Zilberstein D., Ephros M., 2002. Clinical and laboratory aspects of *Leishmania* chemotherapy in the era of drug resistance. World Class Parasites: volume 4. *Kluwer Academic Publishers*.

Zovein A., Edrissian G., Nadim A. 1984. Application of the indirect fluorescent antibody test in serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in experimentally infected mice and naturally infected *Rhombomys opimus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **78**: 73-77.